

**Konstruktion eines Reporter- und eines induzierbaren
Expressionssystems zur Untersuchung der haloarchaealen
Transkription und Translation**

**vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von M. Sc. Johannes Michael Born

Erstgutachterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Darmstadt 2020

Born, Johannes: Konstruktion eines Reporter- und eines induzierbaren Expressionssystems zur Untersuchung der haloarchaealen Transkription und Translation

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2021

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-178519

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2020

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

*Jedes Naturgesetz, das sich dem Beobachter offenbart,
lässt auf ein höheres, noch unerkanntes schließen.*

Alexander von Humboldt

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Born, J. and F. Pfeifer (2019). "Improved GFP Variants to Study Gene Expression in Haloarchaea." *Front Microbiol* 10 (1200): 1200.

Winter, K., **Born, J.** and F. Pfeifer (2018). "Interaction of Haloarchaeal Gas Vesicle Proteins Determined by Split-GFP." *Front Microbiol* 9 (1897): 1897.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	9
2.1. Haloarchaea	9
2.2. Archaeale Transkription und Translation	11
2.2.1. Archaeale Transkription	11
2.2.2. Archaeale Translation	14
2.3. Gasvesikel-kodierende Region	16
2.4. Regulation der Gasvesikelsynthese mittels GvpE und GvpD	19
2.5. GFP als Reporter gen	20
2.6. Induzierbare Expressionssysteme	21
2.6.1. Regulation der Translation mittels Riboswitchen	22
2.7. Ziele der Arbeit	25
3. Material und Methoden	26
3.1. Materialien	26
3.1.1. Chemikalien und Hilfsmittel	26
3.1.2. Verwendete Kits	27
3.1.3. Verwendete DNA modifizierende Enzyme	27
3.1.4. Verwendete Restriktionsendonukleasen	27
3.1.5. Verwendete Oligonukleotide	28
3.1.6. Verwendete Größenstandards	35
3.1.7. Verwendete Vektoren	35
3.1.8. Verwendete Mikroorganismen	35
3.2. Mikrobiologische Methoden	36
3.2.1. Transformation und Kultivierung von <i>E. coli</i>	36
3.2.2. Herstellung chemisch-kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode	36
3.2.3. Transformation und Kultivierung von <i>Hfx. volcanii</i>	37
3.2.4. Wachstumskurven von Haloarchaea	38
3.3. Molekularbiologische Methoden	39
3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
3.3.2. Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion	39
3.3.3. Mutagenese-PCR	40
3.3.4. Reinigung von DNA	40

3.3.5.	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	40
3.3.6.	Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	41
3.3.7.	Dephosphorylierung von DNA	41
3.3.8.	Phosphorylierung von DNA	41
3.3.9.	Ligation	41
3.3.10.	Hybridisierung von Oligonukleotiden	41
3.3.11.	Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	42
3.3.12.	Sequenzierung von DNA	42
3.3.13.	Agarosegelelektrophorese	42
3.4.	Fluoreszenzanalysen	43
3.4.1.	Fluoreszenzmessung bei <i>Hfx. volcanii</i>	43
3.4.2.	Fluoreszenzmikroskopie	43
3.5.	Proteinchemische Methoden	44
3.5.1.	Gewinnung von Gesamtzelllysat aus <i>Hfx. volcanii</i>	44
3.5.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	44
3.5.3.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger	45
3.5.4.	Western Analyse	45
3.5.5.	Bestimmung der BgaH-Aktivität mittels ONPG Test	46
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Aufbau eines auf GFP-basierenden, haloarchaealen Reportersystems	47
4.1.1.	Generierung von haloarchaealen <i>shuttle</i> Vektoren	48
4.1.2.	Untersuchung der Expression in verschiedenen <i>Hfx. volcanii</i> Stämmen	49
4.1.3.	Vergleich von smRS-GFP mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen <i>in vivo</i>	50
4.1.4.	Mutation von smRS-GFP zur Verbesserung der Fluoreszenz	52
4.2.	Validierung des mGFP6-Reportersystems	55
4.2.1.	Charakterisierung von haloarchaealen Promotoren mittels mGFP6 in <i>Hfx. volcanii</i>	55
4.2.2.	Einfluss von haloarchaealen Regulatoren auf die Genexpression	58
4.2.3.	Einfluss der ersten 15 nt auf die Translation der p-gvp-Gene	59
4.2.4.	Effekt der 5'-UTR auf die Translation von p-gvpA, p-gvpD und p-gvpF	64
4.2.5.	Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} durch GvpE	67
4.2.6.	GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD}	73
4.2.7.	Rolle von 5'-UTR _A und 5'-UTR _D bei der GvpE-vermittelten Aktivierung	74
4.3.	Aufbau eines induzierbaren Expressionssystems für Haloarchaea	85

4.3.1.	Einfluss von Theophyllin auf das Wachstum und die Expression von <i>Hfx. volcanii</i>	86
4.3.2.	Theophyllin-abhängige Riboswitche A bis E und E* in <i>Hfx. volcanii</i>	88
4.3.3.	Untersuchung der dosisabhängigen Aktivierung von Riboswitch E in <i>Hfx. volcanii</i>	91
4.3.4.	Kinetik nach Induktion der basalen <i>bgaH</i> -Expression durch Theophyllin	92
4.3.5.	Kinetik der Repression der <i>bgaH</i> -Expression nach Entfernung von Theophyllin	93
4.3.6.	Einfluss der Inkubationstemperatur auf Riboswitch E in <i>Hfx. volcanii</i>	93
4.3.7.	Einfluss der intrazellulären Salzkonzentration auf Riboswitch E in <i>Hfx. volcanii</i>	96
4.3.8.	Aktivierung von Riboswitch E in <i>Hfx. volcanii</i> bei 30 °C und 4 M NaCl	98
4.3.9.	Mutation von Riboswitch E und E*	99
4.4.	Validierung des haloarchaealen, Theophyllin-abhängigen Expressionssystems	101
5.	Diskussion	104
5.1.	GFP-Reportersystem	105
5.2.	Validierung des mGFP6-Reporters	107
5.2.1.	mGFP6 ermöglicht die Charakterisierung verschiedener haloarchaealer Promotoren	107
5.2.2.	Regulation der Translation von <i>p-gvpA</i> , <i>p-gvpO</i> , <i>p-gvpD</i> und <i>p-gvpF</i>	109
5.2.3.	GvpE-vermittelte Aktivierung von <i>P_{pA}</i> und <i>P_{pD}</i>	112
5.2.4.	Anwendung des mGFP6-Reportersystems	114
5.3.	Transfer der Theophyllin-abhängigen Riboswitche in Haloarchaea	116
5.3.1.	Einfluss der Salzkonzentration und Temperatur auf Riboswitch E	120
5.4.	Anwendung eines Theophyllin-regulierten Expressionssystems in Haloarchaea	122
5.5.	Fazit	123
6.	Referenzen	124
7.	Abkürzungsverzeichnis	138
8.	Vorträge und Posterpräsentationen	140
9.	Curriculum Vitae	141
10.	Danksagung	142
11.	Ehrenwörtliche Erklärung	143

1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion und Anwendung eines auf GFP basierenden Reportersystems und eines induzierbaren Genexpressionssystems in Haloarchaea. Die Anwendung von Reporter- oder Expressionssystemen in Haloarchaea ist aufgrund deren hohen, intrazellulären Salzkonzentration limitiert. Somit stehen zur Untersuchung der Regulation der haloarchaealen Genexpression nur wenige solcher Systeme zur Verfügung. Daher wurden bakterielle wie auch eukaryotische Komponenten zum Aufbau eines Reporter- sowie eines induzierbaren Genexpressionssystems in Haloarchaea verwendet. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein auf GFP basierendes Reportersystem konstruiert. Ausgangspunkt war die unter hypersalinen Bedingungen funktionsfähige GFP-Variante smRS-GFP, die sich jedoch zur Quantifizierung schwacher Promotoren als nicht geeignet erwies. Durch die Insertion von insgesamt zehn Aminosäuresubstitutionen in smRS-GFP wurde mGFP6 mit einer 3,3-fach stärkeren Fluoreszenz generiert. Mittels mGFP6 konnten sechs haloarchaeale Promotoren unterschiedlicher Stärke charakterisiert werden. Die höchste Aktivität wiesen die beiden *housekeeping*-Promotoren P_{fdx} des *Ferredoxin*-Gens und P_2 der ribosomalen 16S rRNA auf. Deutlich geringere Aktivitäten sowie ein wachstumsabhängiges Aktivitätsmuster wurden bei den Promotoren P_{pA} , P_{pO} , P_{pD} und P_{pF} der p-vac-Region festgestellt, die die Expression von Gas-Vesikel-Protein-Genen (p-gvp) in *Halobacterium salinarum* PHH1 kontrollieren. Auch zeigte sich eine Regulation ausgehend der 5'-UTR sowie der 12 nt ab Position +1 verschiedener p-gvp-mRNAs. Eine Deletion der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) oder der 12 nt stromabwärts des AUG-Startcodons resultierte immer in eine Erhöhung der Expression. Die Promotoren P_{pA} und P_{pD} werden von dem Aktivatorprotein pGvpE induziert. Mit mGFP6 wurden eine bis zu 13-fache Aktivierung von P_{pA} und eine bis zu 8-fache Aktivierung von P_{pD} durch GvpE festgestellt. Zudem wurde mit mGFP6 ein Einfluss der 5'-UTR des p-gvpD-Gens auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} festgestellt. Von den mittels mGFP6 charakterisierten haloarchaealen Promotoren und Regulatorelementen eigneten sich besonders die beiden starken Promotoren P_{fdx} und P_2 zum Aufbau eines induzierbaren Genexpressionssystems, das im zweiten Teil dieser Arbeit generiert wurde. Im Fokus der regulatorischen Elemente standen hier die synthetischen Theophyllin-abhängigen Riboswitches A bis E und E* (zur Regulation der Translation). Nur die Insertion des Theophyllin-Riboswitches E stromaufwärts des *bgaH*-Reportergens führte zu einer regulierbaren Expression mit einer 3-fachen Aktivierung bei Anwesenheit von Theophyllin. Zudem wurde eine Salz- sowie Temperaturabhängigkeit des Theophyllin-Riboswitches E nachgewiesen, was in einer 12-fachen (bei Erhöhung des Salzgehaltes) beziehungsweise in einer 26-fachen Aktivierung (bei Erniedrigung der Temperatur) der Translation der *bgaH*-mRNA resultierte. Eine vollständige Reprimierung der Expression in Abwesenheit von Theophyllin wurde nicht erreicht. Mit dem mGFP6-Reporter- und dem Theophyllin-abhängigen Genexpressionssystem wurde final ein Zusammenhang zwischen der GvpE-Menge und der Höhe der Aktivierung von P_{pA} festgestellt. Somit stehen nun zwei weitere Werkzeuge zur Untersuchung der haloarchaealen Genexpression zur Verfügung, die zudem miteinander kombiniert werden können.

2. Einleitung

2.1. Haloarchaea

Charakteristisch für Archaea ist ihr häufiges Vorkommen an Orten mit extremen Bedingungen und ihre perfekte Anpassung an das Leben am Limit (Rothschild and Mancinelli, 2001; Thomas and Dieckmann, 2002). Als Kosmopoliten sind Archaeen ubiquitär verbreitet und wurden u. a. in Habitaten mit extremen Temperaturen, hohen Druckverhältnissen, pH-Werten oder Salzgehalten isoliert (Rothschild and Mancinelli, 2001; Woese et al., 1990). Halophile Archaea (Haloarchaea) besiedeln Habitats mit extremen Salzgehalten (1,5 M bis 5,5 M NaCl) wie Salzseen oder Salinen (**Abbildung 1**), und können in moderat halophil und extrem halophil eingeteilt werden (Oren, 2008). Zu den moderat halophilen Vertretern zählen u.a. *Haloferax* (*Hfx.*) *volcanii* oder *Hfx. mediterranei*, deren optimale Salzkonzentration für das Wachstum zwischen 1,5 – 2,5 M NaCl liegt (Berquist et al., 2006). Mit einer optimalen Salzkonzentration zwischen 3,5 – 5,2 M NaCl gehört z. B. *Halobacterium salinarum* (*Hbt. salinarum*) zu den extrem halophilen Archaea (Stoeckenius and Rowen, 1967).

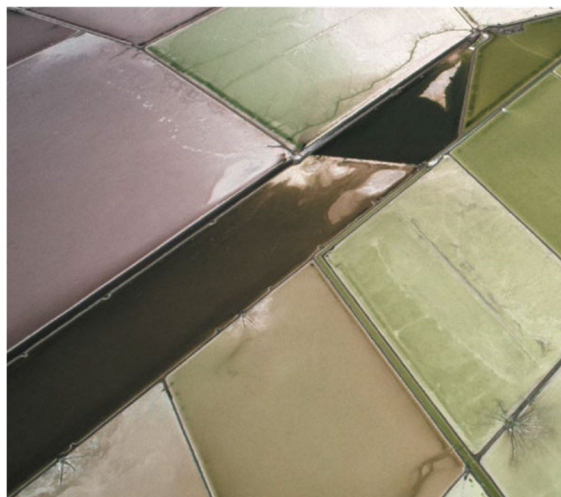


Abbildung 1: Becken zur Salzgewinnung am Großen Salzsee von Utah. Die steigende Salzkonzentration während der Salzgewinnung resultiert in eine Überpopulation von halophilen Archaeen, Bakterien und der Grünalge *Dunaliella salina*, was zu verschiedenen gefärbten Becken führt. Eine rosa Färbung ist ein Indiz für die Anwesenheit von halophilen Archaeen (Oren, 2014; Parkes, 2000).

Um in hypersalinen Habitats leben zu können, verwenden Haloarchaea die *salt-in* Strategie. Durch die Aufnahme von Kalium- und Chlorid-Ionen entsteht ein isoosmotisches Gleichgewicht zwischen dem Zellinneren und dem Außenmedium, wodurch sich die Zelle vor Dehydratisierung im hypersalinen Milieu schützt (Dennis and Shimmin, 1997; Oren, 1999). Extrem halophile Archaea akkumulieren bis zu 4 M KCl und bis zu 1 M NaCl (Christian and Waltho, 1962). Aufgrund dieser hohen intrazellulären Salzkonzentration befindet sich an der Oberfläche ihrer Proteine ein hoher Anteil negativ geladener Aminosäuren (Glutamin- und Asparaginsäure), während das Innere der Proteine überwiegend aus

hydrophoben Aminosäuren besteht. Die negative Ladung an der Proteinoberfläche ermöglicht die Ausbildung einer Hydrathülle, die haloarchaeale Proteine vor den dehydratisierenden Bedingungen im Cytoplasma schützt (Bieger et al., 2003; Britton et al., 2006; Dym et al., 1995; Frolow et al., 1996; Pieper et al., 1998; Yamada et al., 2002). Zudem führt die geringe Anzahl an hydrophoben Aminosäuren im Verhältnis zu einem hohen Anteil an hydrophilen Aminosäuren zu einer niedrigen Hydrophobizität, was Protein-Aggregationen sowie Konformationsänderungen durch Aussalzen reduziert (Dennis and Shimmin, 1997). Zusätzlich stabilisiert werden haloarchaeale Proteine durch Salzbrückenbindungen, die in deren Inneren von negativ und positiv geladenen Aminosäuren ausgebildet werden (Dym et al., 1995).

Neben der optimalen Anpassung an hypersaline Bedingungen weisen viele Haloarchaeen eine hohe Toleranz gegenüber Austrocknung und UV-Strahlung auf. So ist *Hbt. salinarum* in der Lage, durch Austrocknung und UV-Strahlung induzierte DNA-Doppelstrangbrüche hoch effizient zu reparieren (Kottemann et al., 2005). Mutanten von *Hbt. salinarum* zeigten gegenüber ionisierter Strahlung eine höhere Belastungsresistenz als *Deinococcus radiodurans* (DeVeaux et al., 2007). Zudem verfügen Haloarchaea über C₄₀- und C₅₀-Carotinoide (Lycopine und Bakterioruberine), die die Zellen zusätzlich vor photooxidativen Schäden schützen und für deren charakteristische orange-rote Pigmentierung verantwortlich sind (Grant & Larsen, 1989).

Haloarchaea leben überwiegend aerob und heterotroph. Unter anaeroben Bedingungen ist *Hbt. salinarum* in der Lage, durch Fermentation von Arginin wie auch durch Phototrophie Energie zu gewinnen (Hartmann et al., 1980; Schobert and Lanyi, 1982). Neben der Fähigkeit an Oberflächen zu adhären und Biofilme auszubilden (Fröls et al., 2012), sind Haloarchaea wie *Hbt. salinarum* zur Chemotaxis befähigt und können sich mittels Archaeellen aktiv in aquatischen Habitaten fortbewegen (Rudolph and Oesterhelt, 1995).

Einige halophile Vertreter wie *Hbt. salinarum* PHH1 oder *Hfx. mediterranei* sind in der Lage, durch die Bildung von Gasvesikeln passiv in höhere Wasserschichten mit besseren Sauerstoff- sowie Lichtverhältnissen zu gelangen (Pfeifer, 2015; Walsby, 1994). Aufgrund der stark lichtbrechenden Eigenschaften schützen Gasvesikel die Zellen auch vor photooxidativen Schäden und tragen somit zur hohen Resistenz vor UV-Strahlung bei (Grant & Larsen, 1989).

Wie alle Archaea sind Haloarchaeen als Prokaryoten den Bakterien morphologisch und physiologisch ähnlich. Die archaealen Mechanismen zur Informationsprozessierung weisen jedoch einen eukaryotischen Charakter auf, was insbesondere bei der Replikation sowie bei der Transkriptions- und Translationsinitiation deutlich wird (Allers and Mevarech, 2005).

2.2. Archaeale Transkription und Translation

2.2.1. Archaeale Transkription

Auf Basis von rRNA-Sequenzanalysen wurde eine nähere Verwandtschaft der Archaeen zu den Eukaryoten als zu der Domäne der Bacteria nachgewiesen (Woese, 2000, 2002; Woese et al., 1990). So besteht der basale archaeale Transkriptionsapparat aus einer der eukaryotischen RNA-Polymerase-II-ähnlichen RNA-Polymerase (aRNAP) sowie den beiden Transkriptionsregulatoren aTBP (archaeales TATA-Box-Bindeprotein) und aTFB (archaealer Transkriptionsfaktor B), die große Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Transkriptionsfaktoren besitzen (Bell, 2005). Als Erkennungssequenz für TBP dient eine A/T-reiche Sequenz (aTATA-Box), die ungefähr 25 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt liegt und ebenfalls homolog zu den Eukarya ist (Reiter et al., 1990; Reiter et al., 1988; Thomm and Wich, 1988). Direkt hinter der archaealen TATA-Box befindet sich das sogenannte *transcription factor B recognition element* (BR-Element), das die Promotorstärke sowie die Transkriptionsrichtung bestimmt (Hofacker et al., 2004; Pfeifer, 2012; Qureshi et al., 1997).

Trotz der gleichen Faltung der archaealen und eukaryotischen TBP's (Transkriptionsfaktoren B), besitzen diese unterschiedliche Aktivitäten (Qureshi et al., 1997). Studien lassen zudem vermuten, dass verschiedene Isoformen von aTBP und aTFB zu unterschiedlichen Transkriptionsraten führen (Bleiholder et al., 2012; Hidese et al., 2014). Während die meisten Archaea ein *thp*- und ein *tfb*-Leserahmen besitzen, verfügen z. B. *Hfx. volcanii* oder *Hbt. salinarum* über mehrere dieser Gene (Baliga et al., 2000; Bleiholder et al., 2012; Ng et al., 2000; Pfeiffer et al., 2008; Teufel et al., 2008).

Ein weiterer, in einigen Crenarchaeota essentieller Transkriptionsfaktor, ist der archaeale Transkriptionsfaktor E (aTFE), der Ähnlichkeiten zu TFIIE in Eukarya besitzt. *In vitro*-Analysen zeigten eine dreifach höhere Transkriptionsrate bei Anwesenheit von aTFE und lassen eine stabilisierende Rolle innerhalb der Promotor-aTBP-Interaktion bei ungünstigen Bedingungen vermuten (Bell et al., 2001; Hanzelka et al., 2001).

Neben der TATA-Box und dem BR-Element regulieren auch das *initiator element* (INR) und das *promoter proximal element* (PPE) die Transkriptionsinitiation in Archaea. Das schwach konservierte INR befindet sich um den Transkriptionsstart an Position -1/+1 und besteht in Archaea meist aus einem Purin/Pyrimidin-Dinukleotidpaar (Hain et al., 1992; Soppa, 1999). In *Sulfolobus* wurde die Konsensussequenz GAGAMK (M = A/C; K = G/T) zwischen Position +1 und +6 bestimmt. Mutagenese-Analysen zeigten zudem einen Zusammenhang der Promotorstärke und dem INR, was auf eine Interaktion von aTFB sowie der aRNAP mit dem Regulatorelement schließen lässt (Ao et al., 2013). PPE befindet sich ungefähr an Position -10 und steigert durch die Rekrutierung von TFB die Transkriptionsrate (Hain et al., 1992; Peng et al., 2009). Zudem wurde ein Zusammenhang von PPE und der Funktion von TFE α -TFE β festgestellt (Blombach et al., 2015).

Die archaeale Transkriptionsinitiation beginnt mit der Bindung von aTBP an die aTATA-Box und der darauffolgenden Weitung der DNA. Durch das zusätzliche Einbringen von Knickstellen wird die DNA stark aufgewunden und nimmt eine gekrümmte Konformation ein (Bell and Jackson, 1998; Hausner et al., 1996; Littlefield et al., 1999; Rowlands et al., 1994). Anschließend rekrutiert aTBP den Faktor aTFB zu dem entstandenen Protein-DNA-Komplex. Somit besitzt aTBP die gleiche Funktion wie die eukaryotischen TBPs. Der aTBP-DNA-Komplex wird durch die Interaktion von aTFB, der an das BR-Element bindet, stabilisiert (Littlefield et al., 1999; Qureshi and Jackson, 1998). Die beiden Transkriptionsfaktoren rekrutieren anschließend die aRNAP zur Promotorsequenz. Der Austausch der Initiationsfaktoren durch Elongationsfaktoren führt anschließend zur Konformationsänderung der aRNAP und leitet den Übergang von der Transkriptionsinitiation zur Elongation ein (**Abbildung 2**) (Blombach et al., 2013; Chakraborty et al., 2012; Grohmann et al., 2011; Hartzog and Kaplan, 2011; Jun et al., 2014).

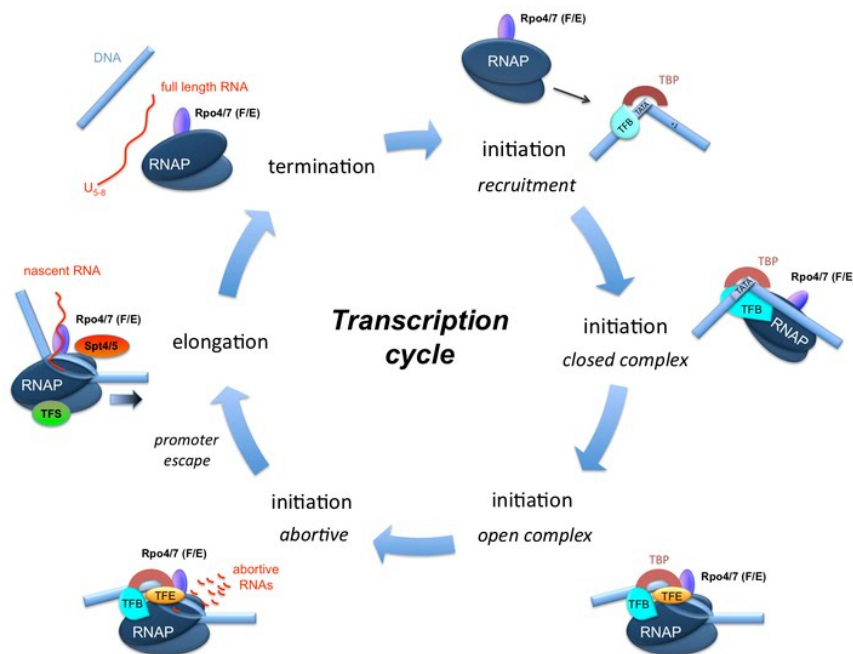


Abbildung 2: Archaeale Transkription. Die archaeale Transkription beginnt mit der Erkennung der TATA-Box und des BR-Elements durch die Transkriptionsfaktoren TFB und TBP und der anschließenden Rekrutierung der aRNAP. Der Komplex wird durch die Interaktion des Transkriptionsfaktors TFE stabilisiert. Der Austausch der Initiationsfaktoren mit Elongationsfaktoren leitet den Übergang in die Elongationsphase ein. Die Transkription wird durch Terminatorelemente beendet ((Smollett et al., 2017); <https://sites.google.com/site/rnaplab/research>, 17.05.2020, 11:35).

Im Gegensatz zu Eukaryoten ist in Archaea kein Transport aus dem Zellkern notwendig und es findet kein Spleißvorgang statt. Zudem erfolgt kein *Capping* des entstehenden Transkripts während der mRNA-Synthese (Kjems et al., 1989; Tang et al., 2002; Tocchini-Valentini et al., 2005). In Archaea sind bis dato nur die zwei Elongationsfaktoren Spt5 und TFS (Transkriptionsfaktor S) genauer untersucht. Für Spt5 wurde eine direkte Bindung an die aRNAP sowie eine Rolle bei der Regulation des Übergangs von der Transkriptionsinitiation zur Elongation postuliert (Hirtreiter et al., 2010). TFS induziert die katalytische Spaltung von pausierenden aRNAP-Komplexen und besitzt Ähnlichkeiten zur TFIIS der Eukarya (Hausner et al., 2000). Neue Studien zeigten, dass Spt5 wie auch TFS dazu beitragen, Histon-induzierte Barrieren zu überwinden (Sanders et al., 2019).

Die Transkriptionstermination erfolgt durch eine steigende Instabilität des Elongationskomplexes und der daraus folgenden Abschwächung des Kontaktes zwischen der RNAP und den Nukleinsäuren. Wie die bakterielle und eukaryotische RNAP ist die aRNAP auch sensitiv gegenüber der intrinsischen wie auch der Faktor-abhängigen Termination (Arimbasseri et al., 2013; Czyz et al., 2014; Santangelo and Reeve, 2006). Die intrinsische Termination resultiert aus einer schwachen Basenpaarung zwischen neu synthetisierter RNA und dem Matrizenstrang (Gusarov and Nudler, 1999; Martin and Tinoco Jr, 1980). In hyperthermophilen Archaea wird diese schwache Bindung durch fünf bis zehn Thymidin-Nukleotide innerhalb des Nicht-Matrizenstrangs ausgelöst. Die Interaktion zwischen dem entstehenden Poly-U-Strang am 3'-Ende ist womöglich nicht ausreichend stabil, was den Elongationskomplex inklusive der aRNAP dissoziieren lässt (Santangelo and Reeve, 2006; Santangelo et al., 2009). So wird die archaeale intrinsische Termination über Oligo(T)-Sequenzen stimuliert und unterscheidet sich von dem RNA-*Hairpin*-abhängigen Mechanismus der Bakterien (Santangelo et al., 2009).

Typische Transkriptionsterminationsfaktoren, wie der bakterielle Rho- (Banerjee et al., 2006) oder der eukaryotische Nsi1-Faktor (Merkl et al., 2014), wurden bislang in Archaea nicht nachgewiesen. Als einziger archaealer Faktor, der den Elongationskomplex stören kann und zu dessen Dissoziation führt, wurde das Protein „euryarchaeale Terminationsaktivität (Eta)“ identifiziert (Walker et al., 2017). Dies zeigt, dass neben der intrinsischen Transkriptionstermination auch die Faktor-abhängige Transkriptionstermination in allen Domänen des Lebens existiert (Arimbasseri et al., 2013; Czyz et al., 2014; Merkl et al., 2014; Roberts, 1969; Santangelo and Reeve, 2006; Walker et al., 2017).

2.2.2. Archaeale Translation

Die Translation stellt wie die Transkription einen essentiellen Prozess des Lebens dar. Die Initiation der Translation erfolgt in allen drei Domänen durch die Bildung eines Translationsapparates, der aus dem Ribosom, der Translationsinitiationsfaktoren (TIFs) und der Initiator-tRNA besteht. Die Verknüpfung einzelner Aminosäuren (Elongation) erfolgt nach der Bindung der Initiator-tRNA am Startcodon der mRNA und endet mit der Termination beim Erreichen eines der drei Stopcodons (Benelli et al., 2017).

Die Translation ist ein in allen drei Domänen des Lebens konservierter, essentieller Prozess. Dennoch zeigt sich innerhalb des Translationsapparats eine Divergenz zwischen Archaea, Bacteria und Eukarya (Benelli et al., 2017). Der Translationsapparat der Archaeen besitzt einen eukaryotischen Charakter, was besonders an den TIFs und der Initiator-tRNA deutlich wird (Bell and Jackson, 1998). So verfügen Archaeen über mehrere verschiedene TIFs, von denen einige Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren besitzen (Londei, 2005). In Bakterien werden hingegen nur drei TIFs benötigt (Laursen et al., 2005). Zudem ist die Initiator-tRNA von Archaeen nicht wie in Bakterien mit N-Formyl-Methionin beladen, sondern transferiert wie in Eukarya Methionin zum AUG-Start (Guillon et al., 2005; Kozak, 1983).

Die archaeale Proteinsynthese weist auch einige bakterielle Merkmale auf. Archaeen besitzen wie Bakterien keinen Zellkern, was die Transkription und die Translation gleichzeitig ablaufen lässt (French et al., 2007). Elektromikroskopische Aufnahmen des thermophilen Archaeons *Thermococcus kodakaraensis* zeigten eine für Bakterien typische Kopplung der Transkription und Translation (French et al., 2007). Zudem kann die archaeale mRNA wie bakterielle Transkripte mono- oder polycistronisch vorliegen und eine Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) innerhalb der untranslatierten Region am 5'-Ende der Transkripte enthalten (Benelli et al., 2017; Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004).

Die bakterielle Translation wird bei Anwesenheit einer SD-Sequenz durch Interaktion des 3'-Endes der ribosomalen 30S Untereinheit mit der SD-Sequenz initiiert (Alberts et al., 2002; Dontsova et al., 1991; Shine and Dalgarno, 1975). Diese Protein-RNA Wechselwirkung wird von den TIFs unterstützt (Simonetti et al., 2009). Nach Bindung der 30S ribosomalen Untereinheit an die RNA bildet diese mit der 50S ribosomalen Untereinheit das 70S Ribosom, das die Erkennung des AUG-Starts durch die Initiator-tRNA ermöglicht (Alberts et al., 2002; Dontsova et al., 1991; Shine and Dalgarno, 1975).

In Archaea scheint die SD-Sequenz eine bedeutend geringere Rolle innerhalb der Translation zu besitzen. Bioinformatische Analysen von 144 Genen aus *Sulfolobus solfataricus* zeigten, dass SD-Sequenzen zum größten Teil bei polycistronischen Transkripten vorkommen, während monocistronische mRNAs meist keine 5'-UTR besitzen (Tolstrup et al., 2000). Untersuchungen von 18 verschiedenen archaealen Genomen zeigten bei neun Genomen einen Anteil an *leaderlosen* Transkripten zwischen 31 und 74% (Torarinsson et al., 2005). In Haloarchaea weisen 30% der mRNAs keine 5'-UTR auf und besitzen somit

keine SD-Sequenz (Slupska et al., 2001; Torarinsson et al., 2005). Ein Beispiel für ein effizient translatiertes, *leaderloses* Transkript ist die mRNA des *Ferredoxin*-Gens (*fdx*) aus *Hbt. salinarum* (Offner et al., 1996; Pfeifer et al., 1993a). Die Insertion von Leserahmen in den Expressionsvektor pJAS35 führt ebenfalls zu *leaderlosen* Transkripten, die effizient exprimiert werden (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Dies lässt vermuten, dass in Archaea mindestens noch ein zweiter Mechanismus der Translationsinitiation existiert, der nicht auf der Erkennung einer SD-Sequenz beruht (Benelli et al., 2003).

Besonders in Haloarchaea scheint die SD-Sequenz die Translation nicht strikt zu regulieren, sondern eher eine unterstützende Rolle einzunehmen. Analysen von 40 Transkripten von *Hfx. volcanii* und *Hbt. salinarum* ergaben, dass der größte Anteil der untersuchten mRNAs keine 5'-UTR besitzt und in Anwesenheit einer 5'-UTR nur 15% eine SD-Sequenz enthalten (Brenneis et al., 2007; Brenneis and Soppa, 2009).

Die SD-Sequenz in *Hbt. salinarum* und *Hfx. volcanii* besitzt die Konsensus-Sequenz 5'-GGAGGUGA-3' mit dem für die Translation wichtigen Kernmotiv 5'-GGAGG-3' (Gupta et al., 1983; Hui and Dennis, 1985; Mankin and Kagramanova, 1986). Mutationen innerhalb des Kernbereichs der SD-Sequenz von p-*gvpH* (SD_H = 5'-GGAGGUCA-3') führen zu einer bis zu 95% verringerten Translation, während Substitutionen im Bereich des 3'-Endes deutlich geringere Auswirkungen auf die Proteinsynthese besitzen (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Mutationen von jeweils 4 nt der SD-Sequenz des p-*gvpH*-Gens von *Hbt. salinarum* resultierte in einer Reduktion der Translation um 5 - 50%. Bei vollständiger Veränderung der SD-Sequenz wurde immer noch eine Translation von 20% der p-*gvpH* mRNA detektiert. Substitutionen innerhalb der SD-Sequenz des *sod*-Gens aus *Hfx. volcanii* zeigten dagegen keinen Effekt auf die Translationsrate, was vermuten lässt, dass diese SD-Sequenz keine Funktion besitzt (Kramer et al., 2014). In *Sulfolobus solfataricus* hingegen führte die Veränderung von einzelnen Nukleotiden der SD-Sequenz bereits zum vollständigen Verlust der Translation *in vitro* (Condò et al., 1999). Somit scheint zum einen die Wichtigkeit der SD-Sequenz in Archaea Art-abhängig zu sein und zum anderen die 5'-UTR bei der archaealen Translation eine bedeutend größere Rolle als die SD-Sequenz einzunehmen.

Der Abstand des Kernmotives vom AUG-Startcodon beträgt in Haloarchaea zwischen 9 und 11 nt (Ma et al., 2002), während für eine effiziente Translation die optimale Entfernung vom AUG-Startcodon und dem 3'-Ende der haloarchaealen SD-Sequenz bei mindestens 3 - 7 nt liegen muss (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004).

Nicht-kodierende Regionen wie die 5'-UTR oder 3'-UTR können auf verschiedenen Wegen die Translation beeinflussen (Brenneis and Soppa, 2009). Im Fall der 5'-UTR können sich Sequenzen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, Proteinbindestellen oder andere Regulationselemente wie Riboswitche befinden (Leppek et al., 2018; Müller-McNicoll et al., 2019). Für Haloarchaea konnte gezeigt werden, dass die Deletion der 5'-UTR von p-*gvpH* von *Hbt. salinarum* zu einer 15-fachen Erhöhung der Translationsrate führt (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Diese negative Regulation durch die 5'-UTR könnte auf der

Ausbildung einer Sekundärstruktur basieren. Studien in *Hfx. volcanii* zeigten einen bedeutenden Einfluss der Sekundärstruktur der 5'-UTR sowie deren Position auf die Translationsinitiation (Brenneis and Soppa, 2009). Zudem wurde bei Anwesenheit einer 5'- und 3'-UTR eine Wachstumsphasen-abhängige Translation beobachtet (Brenneis and Soppa, 2009). Die archaeale Translation ist im Vergleich zur Translation in Eukarya und Bacteria noch wenig untersucht. Forschungen zeigten jedoch, dass die archaeale Translationsinitiation ähnlich wie der eukaryotische *Scanning*-Mechanismus ablaufen könnte oder womöglich ein ganz neuartiger Mechanismus existiert (Brenneis et al., 2007).

Ein Modellsystem zur Untersuchung der Genexpression in Archaea stellt die für Gasvesikelproteine kodierende p-vac-Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 dar. Auf molekularer Ebene ist die Gasvesikelbildung streng reguliert und stellt somit ein geeignetes System zur Untersuchung der archaealen Transkriptions- und Translationsregulation dar.

2.3. Gasvesikel-kodierende Region

Gasvesikel sind intrazelluläre, gasgefüllte Hohlkörper, die von vielen Prokaryoten zum Auftrieb in aquatischen Lebensräumen gebildet werden. Die passive Flotation in höhere Wasserschichten hat den Vorteil, ohne großen Energieaufwand die Zellen in sauerstoff- und nährstoffreichere Wasserschichten sowie in Bereiche mit besseren Lichtverhältnissen zu halten. Dies ermöglicht den Zellen, Energie über den aeroben Stoffwechsel oder über Phototrophie zu gewinnen (Walsby, 1994).

Gasvesikel sind bei Bacteria wie auch Archaea zu finden. Zu den bakteriellen Gasvesikelproduzenten zählen u. a. Cyanobakterien wie *Anabaena*, *Calothrix* und *Nostoc* oder das heterotrophe, gram-negative Bakterium *Ancylobacter aquaticus*. Innerhalb der Domäne der Archaea sind u. a. das methanogene Archaeon *Methanosarcina barkeri* sowie einige halophile Vertreter, wie *Hbt. salinarum* (**Abbildung 3**), *Hfx. mediterranei* oder *Haloquadratum walsbyi*, zur Bildung von Gasvesikeln und somit zur Flotation befähigt (Englert et al., 1990; Mwatha and Grant, 1993; Stoeckenius and Kunau, 1968; Walsby, 1994). Morphologisch sind die meist zylinder- oder spindelförmigen Gasvesikel der einzelnen Mikroorganismen ähnlich und werden von homologen Proteinen aufgebaut, wobei Unterschiede innerhalb der Größe und Form bestehen. So besitzen Gasvesikel in Haloarchaea eine Länge von bis zu 1,5 μm sowie einen Durchmesser von 200 – 250 nm, während Gasvesikel in Bakterien, bei gleicher Länge, mit 33 – 75 nm einen deutlich geringeren Durchmesser aufweisen (Englert et al., 1990; Larsen et al., 1967).

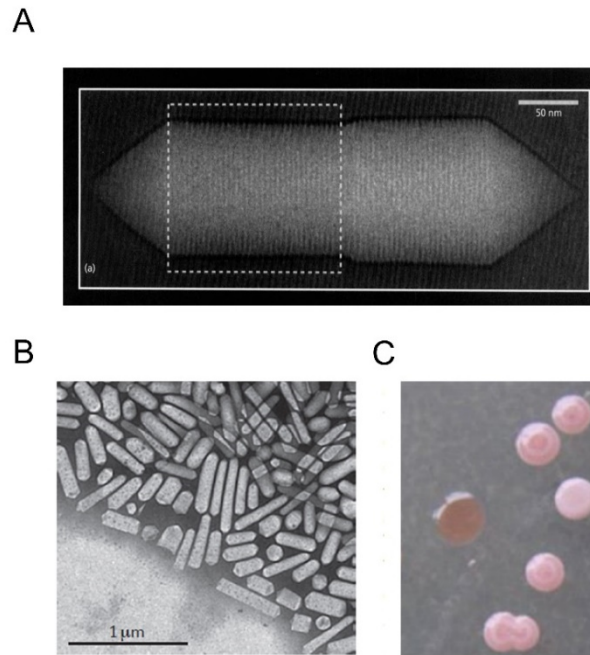


Abbildung 3: Gasvesikel von *Hbt. salinarum*. A: Zylindrisches Gasvesikel. Die typischen Rippen werden durch das Hauptstrukturprotein GvpA gebildet (Offner et al., 1998). B: Isolierte Gasvesikel (Pfeifer, 2012). C: Kolonien von Gasvesikel-positiven (rosa) und -negativen (rot) Zellen (Pfeifer, 2015).

In Haloarchaea besitzt die 2 nm dicke Gasvesikelhülle eine innere, hydrophobe Seite und eine, dem Cytoplasma zugewandte, hydrophile, äußere Oberfläche. Die hydrophobe innere Seite rührt von dem sehr hydrophoben Hauptstrukturprotein GvpA (8 kDa), welches mehr als 95% des kompletten Gasvesikels ausmacht (Pfeifer, 2012, 2015). Die hydrophile Oberfläche wird durch das 42 kDa große GvpC-Protein gebildet. GvpC adhärirt an der äußeren Oberfläche der GvpA-Hülle und verleiht dem Gasvesikel Stabilität. Im Gegensatz zu GvpA, das die rippenartige Wand bildet, ist GvpC nicht notwendig für die Bildung eines Gasvesikels, es beeinflusst aber seine Form und Stabilität (Pfeifer, 2015). Insgesamt sind an der haloarchaealen Gasvesikelbildung 14 Proteine beteiligt, von denen acht essentiell sind. Zu diesen essentiellen Proteinen gehören neben GvpA auch GvpO, F, G, J, K, L und GvpM. Die fünf weiteren Gvp-Proteine GvpN, D, E, G und H sind wie GvpC nicht für die Gasvesikelbildung notwendig, beeinflussen diese aber maßgeblich (Offner et al., 2000; Pfeifer, 2015). Die bei der Gasvesikelbildung involvierten 14 Gene (*gvp*-Gene) sind in der *p-vac*-Region (*gas vacuole coding region*) von *Hbt. salinarum* PHH1 in den zwei entgegengesetzt orientierten Genclustern *p-gvpACNO* und *p-gvpDEFGHIJKLM* angeordnet (**Abbildung 4**) (Englert et al., 1992a; 1992b).



Abbildung 4: Schematische Darstellung der *p-vac*-Region. Die Transkription der *p-vac*-Region wird von den vier Promotoren P_{pA} und P_{pO} sowie P_{pD} und P_{pF} gesteuert.

Die Transkription der p-vac-Region beginnt mit der Synthese der mRNA von p-gvpFGHIJKLM, gefolgt von p-gvpDE, p-gvpACNO und p-gvpO und wird von den vier Promotoren P_{pA} und P_{pO} sowie P_{pD} und P_{pF} gesteuert. Die höchste Aktivität besitzt der P_{pA} -Promotor und führt zu Bildung des monocistronischen p-gvpA- und des polycistronischen p-gvpACNO-Transkripts (Gregor and Pfeifer, 2001; Hofacker et al., 2004; Krüger and Pfeifer, 1996; Röder and Pfeifer, 1996). Während das p-gvpA-Transkript in großen Mengen synthetisiert wird, ist die p-gvpACNO-mRNA in deutlich geringeren Mengen vorhanden (Offner et al., 1996). Dies lässt eine starke Transkriptionstermination vermuten. Die Stärke des P_{pO} -Promotors, der die Transkription von p-gvpO kontrolliert, konnte bis dato noch nicht quantifiziert werden (Hofacker et al., 2004).

In entgegengesetzter Richtung erfolgt die Synthese der p-gvpDE- bzw. p-gvpFGHIJKLM-mRNA, die von den Promotoren P_{pD} bzw. P_{pF} gesteuert wird (Englert et al., 1992a; 1992b; Hofacker et al., 2004).

Mit Ausnahme der p-gvpO-mRNA enthalten alle Transkripte der p-vac-Region eine 5'-UTR, die Einfluss auf die Translation der jeweiligen mRNA nimmt. Den kleinsten *leader*-Bereich besitzt p-gvpA (5'-UTR_A) mit 20 nt, gefolgt von der 5'-UTR von p-gvpD (5'-UTR_D) und p-gvpF (5'-UTR_F) mit einer Länge von 72 nt bzw. 169 nt (**Abbildung 5**) (Pfeifer, 2015). Abgesehen von p-gvpA und p-gvpO befindet sich innerhalb der *leader*-Bereiche aller offener Leserahmen der p-vac-Region eine putative SD-Sequenz. Die Übereinstimmung mit der Konsensussequenz 5'-GGAGGUGA-3' von *Hbt. salinarum* und *Hfx. volcanii* liegt bei mindestens 50%. Im Fall von p-gvpI wurde eine 100%ige Übereinstimmung mit der Konsensussequenz detektiert (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Die jeweiligen SD-Sequenzen sind 5 bis 13 nt vor dem entsprechenden AUG-Startcodon lokalisiert (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004).

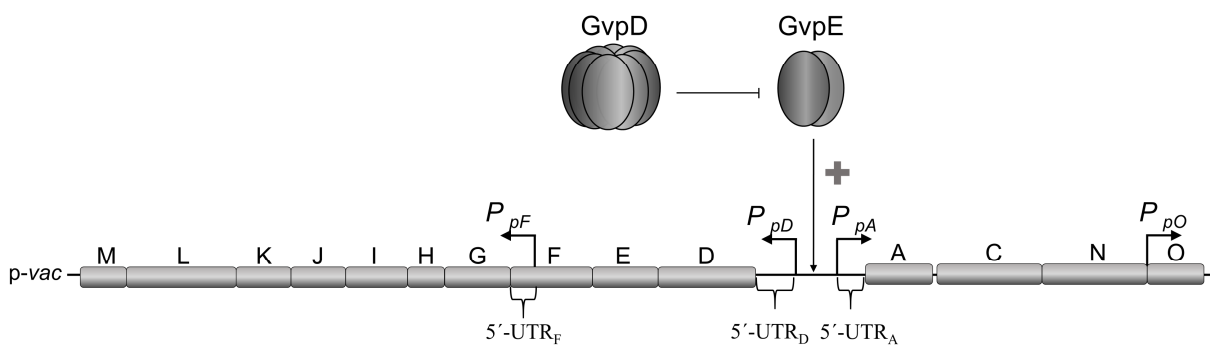


Abbildung 5: Regulation der Genexpression der p-vac-Region. Die Expression wird von den vier Promotoren P_{pA} , P_{pD} , P_{pF} und P_{pO} bestimmt. Die Aktivität von P_{pA} und P_{pD} wird durch den endogenen Aktivator pGvpE verstärkt. Bei Vorhandensein von pGvpD nimmt die Menge an pGvpE ab, was zu einer verminderten Expression führt. Die p-gvpACNO-, p-gvpDE- und p-gvpFGHIJKLM-Transkripte enthalten eine 5'-UTR von 20, 72 bzw. 169 nt.

Neben der Regulation auf translationaler Ebene wird die Gasvesikelbildung auch auf transkriptioneller Ebene aktiviert. Die Aktivierung erfolgt durch GvpE, dessen Menge durch das Protein GvpD reduziert werden kann (Hofacker et al., 2004).

2.4. Regulation der Gasvesikelsynthese mittels GvpE und GvpD

Die Regulation der Gasvesikelsynthese der p-vac-Region erfolgt auf Transkriptionsebene durch den Transkriptionsaktivator GvpE und dem repressorischen Protein GvpD (**Abbildung 5**) (Hofacker et al., 2004). Das 21 kDa große GvpE aktiviert die P_{pA} - und P_{pD} -Promotoren, während P_{pF} und P_{pO} nicht von GvpE aktiviert werden (Bauer et al., 2008; Gregor and Pfeifer, 2005; Hofacker et al., 2004; Krüger et al., 1998; Röder and Pfeifer, 1996; Zimmermann and Pfeifer, 2003). Studien mittels einer haloarchaealen β -Galaktosidase (BgaH) als Reporter zeigten eine 70- bis 100-fache Induktion von P_{pA} und eine 20- bis 40-fache Aktivierung von P_{pD} durch GvpE (Gregor and Pfeifer, 2001).

Die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} benötigt jeweils eine 20 nt lange Sequenz (*upstream activating sequence*, UAS), die sich in der 35 nt großen intergenen Region zwischen beiden Promotoren befindet. Die UAS von P_{pA} (UAS_A) sowie P_{pD} (UAS_D) enthält zwei 8 nt lange, konservierte Sequenzen (UAS_A 1/UAS_A 2 sowie UAS_D 1/UAS_D 2), die jeweils von 4 nt getrennt werden. Während sich UAS_A 1 und UAS_D 1 im Zentrum 7 nt überlappen, befinden sich UAS_A 2 und UAS_D 2 jeweils 1 nt *upstream* des BR-Elements von P_{pA} bzw. P_{pD} (Bauer et al., 2008; Marschaus and Pfeifer, 2012) (**Abbildung 6**). Eine Bindung von GvpE an die DNA wurde bis dato nicht nachgewiesen.

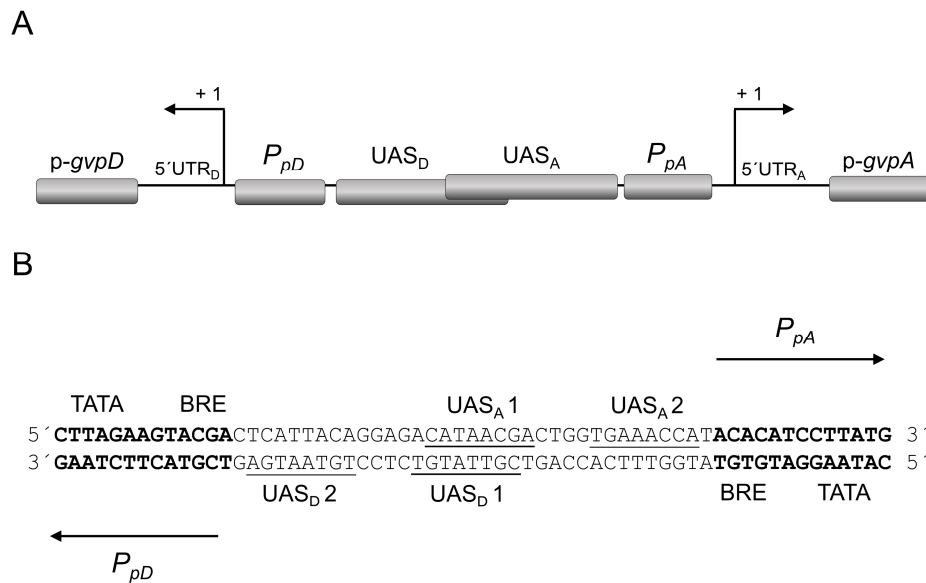


Abbildung 6: Intergener Bereich zwischen p-gvpA und p-gvpD. **A:** Schematische Darstellung der P_{pA} - P_{pD} -Promotorregion. In der 35 nt langen Sequenz zwischen P_{pA} und P_{pD} befinden sich die zur GvpE-vermittelten Aktivierung benötigten *upstream activator sequences* (UAS). Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. **B:** Sequenz der P_{pD} - P_{pA} -Promotorregion. Die einzelnen UAS-Elemente sind jeweils durch 4 nt voneinander getrennt. Die beiden UAS 1 Elemente überlappen im Zentrum 7 nt, während die UAS 2 Elemente 1 nt genau vom jeweiligen BR-Element lokalisiert sind.

Interaktionsstudien zeigten eine Wechselwirkung von GvpE mit den Transkriptionsfaktoren TBP und TFB (Bleiholder et al., 2012; Teufel and Pfeifer, 2010). Aufgrund der räumlichen Nähe der UAS zum jeweiligen Promotor könnte GvpE die Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit dem BR-Element sowie der TATA-Box erleichtern und dadurch die Transkriptionsrate stark erhöhen (Bleiholder et al., 2012; Teufel and Pfeifer, 2010). Die Anwesenheit von GvpD führt zu einer Verringerung der GvpE-Menge und somit zu einer schwächeren GvpE-vermittelten Aktivierung. *In vitro*-Studien zeigen eine Interaktion von GvpD und GvpE (Scheuch et al., 2008; Scheuch and Pfeifer, 2007; Schmidt and Pfeifer, 2013; Zimmermann and Pfeifer, 2003). Zur Quantifizierung des Abbaus durch GvpD anhand der GvpE-Menge wurde eine Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) verwendet. Durch die Fusion von smRS-GFP am N-terminalen Ende von GvpE wurde in Anwesenheit von GvpD ein Rückgang der smRS-GFP-GvpE-Menge von über 60% detektiert. Die Fusion von smRS-GFP an das C-terminale Ende von GvpE führt dagegen zu keiner Veränderung der Fluoreszenz in Gegenwart von GvpD, was eine Interaktion am N-Terminus von GvpE vermuten lässt (Schmidt and Pfeifer, 2013). Eine Interaktion von GvpD mit der Promotorsequenz wurde nicht beobachtet. Auch in früheren Studien wurde smRS-GFP bereits erfolgreich zur Untersuchung des Proteinabbaus in Haloarchaea eingesetzt (Reuter and Maupin-Furlow, 2004). Zur Untersuchung der haloarchaealen Genexpression wurde smRS-GFP aber bis dato noch nicht angewandt. In Bakterien zeigte die Verwendung von smRS-GFP als Reportergen für Promotorstudien im Gegensatz zu enzymatischen Assays viele Vorteile, weshalb smRS-GFP ein geeigneter Kandidat zur Analyse der haloarchaealen Transkription und Translation darstellt.

2.5. GFP als Reportergen

In Haloarchaea wurden bisher enzymatische Assays zur Bestimmung von Promotoraktivitäten eingesetzt. Häufig angewandte Reporter sind die Beta-Galaktosidase (BgaH) von *Hfx. alicantei* und die Dihydrofolatreduktase von *Hfx. volcanii* (Danner and Soppa, 1996; Gregor and Pfeifer, 2001). In *E. coli* ist das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* ein alternativer Reporter (Lisemore et al., 2000; Tsien, 1998). Im Vergleich zu enzymatischen Assays sind GFP-Fluoreszenzanalysen weniger zeitaufwendig, benötigen keine zusätzlichen Substrate und/oder Kofaktoren und es ist keine Zellyse erforderlich. Die Untersuchungen können auch *in vivo* durchgeführt werden. Die Fusion des *gfp*-Leserahmens mit dem zu untersuchenden Promotor führt in Transformanten zu fluoreszierenden Zellen, wenn GFP gebildet wird. Die Stärke des GFP-Signals korreliert mit der Aktivität des Promotors und damit mit der Expression des untersuchten Gens (Albano et al., 1996; Albano et al., 1998).

Im Gegensatz zu Bakterien und Eukaryoten ist die Verwendung von GFP in Archaea aufgrund ihrer extremen Lebensbedingungen immer noch selten. So ist in Haloarchaeen die Anwendung von GFP wegen der hohen intrazellulären Salzkonzentration von 2 - 5,3 M KCl und einem Temperaturoptimum von 42 °C eingeschränkt (Cormack et al., 1996; Enoki et al., 2004; Nomura and Harada, 1998; Oren, 2002; Patterson et al., 1997; Reuter and Maupin-Furlow, 2004; Stepanenko et al., 2014). Wie bereits erwähnt,

stellt das *short-lived, red-shifted* smRS-GFP, das zur Untersuchung des Proteinabbaus in *Hfx. volcanii* verwendet wurde, ein GFP-Derivat mit einer adäquaten Fluoreszenz in Haloarchaea dar (Reuter und Maupin-Furlow, 2004; Schmidt und Pfeifer, 2013). SmRS-GFP trägt die Substitutionen S65T, Q80R, P99S, M153T und V163A, wodurch seine Löslichkeit und Thermostabilität im haloarchaealen, intrazellulären Milieu verbessert wird (Baffour-Awuah et al., 2005; Reuter and Maupin-Furlow, 2004). Im Laufe der Zeit wurden durch Mutationen eine Vielzahl an GFP-Varianten generiert, die in Eukaryoten und Bakterien verbesserte Eigenschaften aufwiesen. So wurde durch die Substitution F64L die Reifungsrate des Wildtyp-GFPs bei 37 °C deutlich verbessert, was zu einer starken Erhöhung der GFP-Fluoreszenz in *E. coli* führte (Cormack et al., 1996; Scholz et al., 2000). Durch den Austausch von Alanin 206, Leucin 221 und Phenylalanin 223 durch Arginin oder Lysin wurde deren Dimerisierungspotential deutlich reduziert und monomerische GFP-Proteine generiert. So konnte das hohe Aggregationsverhalten von GFP verringert werden, was sich positiv auf die Fluoreszenzintensität auswirkte (Enoki et al., 2004; Jackson et al., 2006; Zacharias et al., 2002). Die Substitutionen S30R, Y39N, S147P oder N149K verbessern die Faltungsrate und die Proteinstabilität und tragen so zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität bei (Kimata et al., 1997; Kremers et al., 2006; Pédelacq et al., 2005).

Neben stärker fluoreszierenden GFP-Varianten wurden durch Mutationen auch Fluoreszenzproteine mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen produziert. Die Substitution von Tyrosin 66 im aktiven Zentrum führte zu blau fluoreszierenden (BFP) sowie cyan fluoreszierenden Proteinen (CFP) (Heim et al., 1994). Eine Gelbverschiebung der Emission wurde durch Mutationen von Threonin 203 erreicht und gelb fluoreszierende Proteine (YFP) generiert (Griesbeck et al., 2001). Ein auf GFP basierendes, rot fluoreszierendes Protein wurde bis dato nicht erhalten (Miyawaki et al., 2012). Fluoreszenzproteine mit einer Emission im roten Wellenlängenbereich, wie mCherry, sind von DsRed aus der Seeanemone *Discosoma* abgeleitet (Dietrich and Maiss, 2002; Miyawaki et al., 2012; Shu et al., 2006).

2.6. Induzierbare Expressionssysteme

Induzierbare Expressionssysteme ermöglichen die Steuerung der Proteinbiosynthese auf transkriptioneller und/oder translationaler Ebene. Der Vorteil der konditionalen Genexpression liegt in der Möglichkeit, die Expression bestimmter Gene zu definierten Zeitpunkten an- oder abzuschalten. In Bakterien und Eukaryoten werden induzierbare Expressionssysteme genutzt, um Stoffwechselwege oder Genregulationen zu untersuchen sowie heterolog Proteine zu synthetisieren (Geraskina et al., 2019; Honjo et al., 2019; Martins-Santana et al., 2018). In Haloarchaea kann die Transkription von Genen unter Kontrolle des Tryptophan-induzierbaren *p.tnA*-Promotors oder des K⁺-abhängigen Promotors *P_{kdp}* reguliert werden (Allers et al., 2010; Kixmuller and Greie, 2012). Die Steuerung erfolgt hier ausgehend von nicht inerten Liganden, die metabolisiert werden können, weswegen eine Veränderung der physiologischen Eigenschaften der Zelle nicht ausgeschlossen werden kann. In Bakterien und Eukaryoten stehen hingegen eine Vielzahl von Regulationssystemen zur Verfügung, deren Induktoren nicht natürlich in den Zellen vorkommen.

2.6.1. Regulation der Translation mittels Riboswitchen

Als gute Steuerungselemente zur Kontrolle der Translation haben sich Riboswitches erwiesen, die *cis*- wie auch *trans*-regulierend sein können und sich meist innerhalb der 5'-UTR befinden (Breaker, 2012; Mellin and Cossart, 2015). Riboswitches sind RNA-Strukturelemente, die aus einer Sensordomäne, dem sogenannten Aptamer, und einer Regulator-domäne, der sogenannten Expressionsplattform, bestehen. Das Aptamer und die Expressionsplattform sind nicht klar voneinander abgegrenzt.

Durch die komplexe dreidimensionale Struktur sind Aptamere in der Lage, Liganden, wie Theophyllin oder Tetrazyklin hochaffin zu binden (Rudolph et al., 2013; Suess et al., 2003). Die Interaktion mit dem Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Aptamers, was direkt an die Expressionsplattform weitergeleitet wird. Die Expressionsplattform erfährt ebenfalls eine strukturelle Änderung, wodurch die Transkription oder die Translation der nachfolgenden Gene gesteuert wird. Die Steuerung in Bakterien erfolgt meist aufgrund der Maskierung der zur Translation in Bakterien notwendigen SD-Sequenz (Breaker, 2012).

In Bakterien kommt eine Vielzahl an unterschiedlichen, natürlichen Riboswitchen vor, die in mehr als 20 Klassen eingeteilt werden. Diese Riboswitches sind in der Lage verschiedene Substanzen wie z. B. Aminosäuren, enzymatische Kofaktoren, Nukleinbasen oder anorganische Liganden zu binden (Lunse et al., 2014). So wurden u. a. Riboswitches mit Affinität zu Adenosyl-Cobalamin, Thiaminpyrophosphat (TPP) und Flavinmononukleotid (FMN) identifiziert (Mironov et al., 2002; Nahvi et al., 2002; Winkler et al., 2002). In Eukaryoten sind TPP-Riboswitches im Spleißvorgang involviert (Wachter, 2010). Bioinformatische Studien zeigten auch bei Archaea putative Riboswitches, die Ähnlichkeiten zu TPP-, FMN-, Guanidin-, Lysin- und c-di-AMP-Riboswitches aufweisen (Gupta and Swati, 2019). Im hyperthermophilen Archaeon *Thermococcus kodakarensis* wurde ein Fluorid-bindender Riboswitch identifiziert, der die Expression von Genen, die an dem Fluorid-Export beteiligt sind, reguliert (Speed et al., 2018).

Neben natürlichen Riboswitchen wurde zur konditionalen Genexpression in Bakterien und Eukaryoten eine Vielzahl an synthetischen Riboswitchen konstruiert (Suess et al., 2003; Topp et al., 2011). Als Vorlage dienen hier die natürlichen Mechanismen der Transkription bzw. der Translation, die mit neuartigen Aptameren reguliert werden sollen. Als Liganden werden meist Tetrazyklin, Neomycin oder Theophyllin genutzt, wobei letzteres aufgrund seiner geringen toxischen Wirkung die größte Verwendung findet. Mittels der Insertion des Theophyllin-bindenden Aptamers in der Nähe der Ribosomenbindestelle konnte die Translation in *Bacillus subtilis* gesteuert werden. Die Regulation basiert auf der Demaskierung der Ribosomenbindestelle. In Anwesenheit von Theophyllin erfolgt eine Konformationsänderung des Aptamers, wodurch das Ribosom Zugang zur mRNA erhält und die Translation erfolgen kann (Suess et al., 2004).

In Eukaryoten werden Riboswitche ebenfalls angewandt. Dazu wird ein Aptamer zwischen *cap*-Struktur und dem AUG-Startcodon inseriert. Erfolgreich wurden hier neben dem Theophyllin- auch das Biotin- und das Tetracyklin-Aptamer verwendet (Harvey et al., 2002; Suess et al., 2003). Zudem wurden Riboswitche zur Steuerung des Spleißens verwendet (Weigand and Suess, 2007). Zur Steuerung der eukaryotischen Genexpression werden auch andere Mechanismen wie die RNA-Interferenz (RNAi) mittels Riboswitchen eingesetzt (Groher and Suess, 2014).

Die Integration der SD-Sequenz in den P1 Stamm des Tetracyklin-Aptamers führt beim methanogenen Archaeon *Methanosarcina acetivorans* zur erfolgreichen Regulierung der Expression des β -Lactamase-Gens (Demolli et al., 2014). Im Gegensatz dazu resultierte in Haloarchaea die Fusion des Tetrazyklin-Aptamers an die *leaderlose* mRNA von *dhfr* zur vollständigen Repression der Translation in An- wie auch Abwesenheit von Tc. Hier wurde eine stabilisierende Wirkung der hohen intrazellulären Ionenkonzentration von *Hfx. volcanii* angenommen (Hering et al., 2009). Die Repression der Translation erfolgte aber nur bei der Insertion des Aptamers direkt vor dem AUG-Start. Wird das Aptamer ans 5'-Ende des Transkripts fusioniert, zeigt sich kein Einfluss auf die Translationseffizienz. Somit führt die Ausbildung einer Sekundärstruktur am Anfang der 5'-UTR zu keiner Behinderung der Translation, weswegen eine Bindung des Ribosoms am Anfangsbereichs des *leaders* und ein darauffolgendes *Scannen* zum AUG-Start nach Hering et al. nicht anzunehmen ist. Vielmehr könnte ein Erkennungsmechanismus des Startcodons für die Translationsinitiation ausschlaggebend sein (Hering et al., 2009).

Da die SD-Sequenz nicht essentiell für die haloarchaeale Translation ist, ist für deren Repression die Maskierung des AUG-Startcodons notwendig. Einige der wenigen Riboswitche, bei denen neben der SD-Sequenz auch eine Maskierung des AUG-Startcodons vorhergesagt wird, sind die sechs Theophyllin-abhängigen Riboswitche A – E und E* , die durch die Gruppe um Justin P. Gallivan entwickelt und charakterisiert wurden (Lynch et al., 2007; Topp and Gallivan, 2008a; Topp et al., 2011). Bei Bindung von Theophyllin an das Aptamer erfolgt die Auflösung der Sekundärstruktur, wodurch das Ribosom mit der wieder einzelsträngig vorliegenden Translationsinitiationsregion interagieren kann und die Translation startet (**Abbildung 7**).

Der Theophyllin-Riboswitch wurde bereits in vielen unterschiedlichen Organismen erfolgreich angewandt, was eine hohe Übertragbarkeit dieses Regulationssystems zeigt. So konnten Theophyllin-abhängige Riboswitche außer in *E. coli* (Topp and Gallivan, 2008b) auch in *Synechococcus elongatus* (Nakahira et al., 2013), *Streptomyces coelicolor* (Rudolph et al., 2013), *Mycobacterium tuberculosis* (Seeliger et al., 2012) und *Francisella novicida* (Reynosos et al., 2012) verwendet werden.

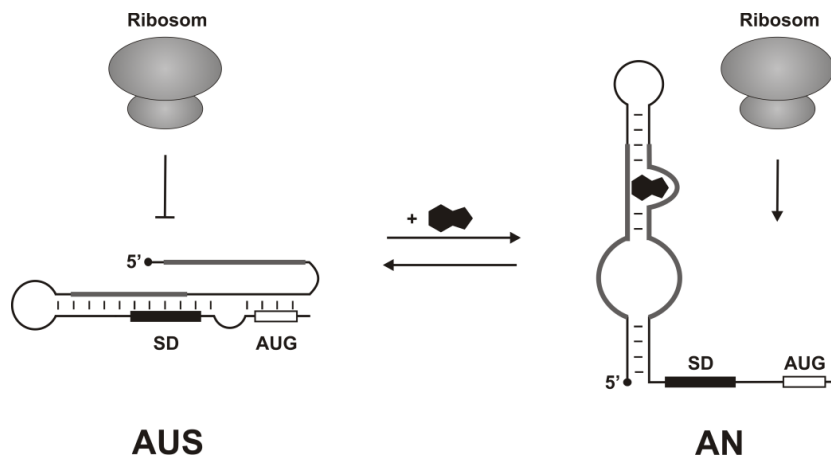


Abbildung 7: Regulation der Translationsinitiation durch den Theophyllin-abhängigen Riboswitch E*. Die Steuerung der Translation erfolgt über die Maskierung der SD-Sequenz und des AUG-Startcodons. Durch die Interaktion des Aptameres mit Theophyllin erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch die SD-Sequenz wie auch der AUG-Start für das Ribosom zugänglich wird (Rudolph et al., 2015).

In Haloarchaea wurden synthetische Riboswitche bis dato noch nicht erfolgreich angewandt, was u. a. auf die hohen intrazellulären Salzkonzentrationen zurückzuführen ist. Die hohe Ionenkonzentration führt zur Aggregation oder generell zur Inaktivierung von Proteinen durch verstärkte hydrophobe Wechselwirkungen. Zudem werden elektrostatische Wechselwirkungen innerhalb oder zwischen den Makromolekülen gestört. Auch aufgrund der Hydratation wird die Verfügbarkeit von freiem Wasser reduziert, was ebenfalls in einer Denaturierung der Proteine resultiert (Dennis and Shimmin, 1997). Daher ist die Verwendung von eukaryotischen oder bakteriellen Reportergenen oder Expressionssystemen eingeschränkt und ein Transfer in Haloarchaea meist schwierig.

2.7. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte ein geeignetes Reporter- sowie ein konditionales Genexpressionssystem zur Untersuchung der Transkription und Translation in Haloarchaea etabliert werden. Das Reportersystem sollte auf dem in Hochsalz funktionsfähigen smRS-GFP basieren. Zur Validierung des Reportersystems sollten verschiedene haloarchaeale Promotoren sowie das Regulationssystem der p-vac-Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 verwendet werden. Daher wurden neben den haloarchaealen Promotoren auch SD-Sequenzen sowie die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} der p-vac-Region mittels GFP als Reporter untersucht. Die Charakterisierung erfolgte auch in Hinblick auf ihren Einsatz innerhalb eines konditionalen Genexpressionssystems für Haloarchaea, welches im zweiten Teil dieser Arbeit konstruiert wurde.

Dazu sollten haloarchaeale Regulationselemente mit bakteriellen, induzierbaren Komponenten zu einem konditionalen Genexpressionssystem kombiniert werden. Ein besonderes Augenmerk lag auf den synthetisch hergestellten Theophyllin-abhängigen Riboswitchen A – E und E* von Gallivan. Hier sollte getestet werden, ob diese steuerbaren Regulatoren mit der archaealen Transkriptions- und Translationsmaschinerie in Haloarchaea funktionieren. Dieses Projekt sollte deshalb auch Aufschluss darüber geben, ob bakterielle Genregulationssysteme auf Archaea übertragbar sind.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien und Hilfsmittel

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Acrylamid (30% w/v)/ Bisacrylamid (0,8% w/v)	Carl Roth GmbH und Co. KG; Karlsruhe
Agarose Biozym ME Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck KGaA; Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH und Co. KG; Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco Laboratories Inc, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories Inc, Detroit, USA
Bovines Serumalbumin	SIGMA ALDRICH; St. Luis, USA
Bromphenolblau	Merck KGaA; Darmstadt
Calciumchlorid Dihydrat	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Casaminoäure	Difco Laboratories Inc, Detroit, USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth GmbH und Co. KG; Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA; Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA; Darmstadt
dNTPs	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (unvergällt)	VWR Internat. SA, Fontenay sous Bois, Frankreich
Ethanol (vergällt)	Bioenergie Icking GmbH, Großbeuthen
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
ε-Aminocapronsäure	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Koffein	Fluka (Schweiz)
L-Histidinhydrochlorid Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Manganchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	VWR International S.A.S., Frankreich
Mevinolin/Lovastatin	Alfa Aesar GmbH & Co KG; Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Odissey-Blocking-Buffer	Licor Bioscience, Nebraska, USA
ortho-Nitrophenylgalaktopyranosid (ONPG)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ortho-Phosphorsäure	VWR International S.A.S., Frankreich
Oxid-Hefeextrakt	Oxoid Ltd., Hampshire, England
Polyethylenglycol ₆₀₀ (PEG ₆₀₀)	SIGMA ALDRICH; St. Luis, USA
Polysorbat 20 (Tween-20)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Fluoro PDVF Membran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saccharose/Sucrose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED (N'N'N'N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Theophyllin	SIGMA ALDRICH; St. Luis, USA
Thymidin	Fluka (Schweiz)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TritonX-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Uracil	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Whatman-Papier	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Sämtliche hier nicht aufgeführte Chemikalien und Hilfsmittel stammen von den Firmen AppliChem, Boehringer Ingelheim, der Merck KGaA, Carl Roth GmbH & Co, SIGMA ALDRICH und der Serva Electrophoresis GmbH.

3.1.2. Verwendete Kits

Kit	Hersteller
E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I	Omega Bio-Tek, Norcross, USA
Gen Elute™ PCR Clean-Up Kit (Reinigung von PCR-Produkten)	SIGMA ALDRICH; St. Luis, USA
DNA Clean & Concentrator-5 (Reinigung von restringierten Plasmiden)	Zymo Research (Freiburg)

3.1.3. Verwendete DNA modifizierende Enzyme

Enzym	Hersteller
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSap)	New England BioLabs, Frankfurt am Main
T4-Phosphonukleotidkinase (T4-PNK)	New England BioLabs, Frankfurt am Main
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs, Frankfurt am Main
DNaseI (1 U/μl, RNase-frei)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

3.1.4. Verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Enzym	Erkennungssequenz
<i>AscI</i>	5'...GG CGCGCC...3' 3'...CCGCGC GG...5'	<i>BamHI</i> -HF	5'...G GATCC...3' 3'...CCTAG G...5'
<i>BglII</i>	5'...A GATCT...3' 3'...TCTAG A...5'	<i>DpnI</i>	5'...GA ^{CH₃} TC...3' 3'...CT A ^{CH₃} G...5'
<i>EcoRI</i> -HF	5'...G AATTC...3' 3'...CTTAA G...5'	<i>HindIII</i> -HF	5'...A AGCTT...3' 3'...TTCGA A...5'
<i>NcoI</i> -HF	5'...C CATGG...3' 3'...GGTAC C...5'	<i>NheI</i> -HF	5'...G CTAGC...3' 3'...CGATC G...5'
<i>NotI</i> -HF	5'...GC GGCCGC...3' 3'...CGCCGG CG...5'	<i>SpeI</i> -HF	5'...A CTAGT...3' 3'...TGATC A...5'
<i>KpnI</i> -HF	5'...GGTAC C...3' 3'...C CATGG...5'	<i>XbaI</i>	5'...T CTAGA...3' 3'...AGATC T...5'

Die hier aufgeführten Restriktionsendonukleasen sind von der Firma New England BioLabs, Frankfurt am Main.

3.1.5. Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Konstruktion von pLacZJB17. Die komplementären Bereiche sind mit kleinen Buchstaben geschrieben. Die Erkennungssequenz von *Bam*HI und *Kpn*I ist unterstrichen.

Name	Sequenz (5'- 3')
pLacJB18_1_fwd	ttcgctacctggaGAGACGCGCCCGCTGATC
pLacJB18_1_rev	actcggtcggttaaCGCGCCGAAAAATGCGATG
pLacJB18_2_fwd	atttttcgcgcgTTACCGACCGAGTTCGGCG
pLacJB18_2_rev	ggtcgagtcgccACGTTCGACCCCGACGCG
pLacJB18_3_fwd	cggggtcgaactCGGCGACTCGACCTCGAAG
pLacJB18_3_rev	acaaataggggtCCGATGACCGGCTCGTCC
pLacJB18_4_fwd	agccggtcatcgAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATG
pLacJB18_4_rev	aatccatgtttaTCTTCGCTTCCTCGCTC
pLacJB18_5_fwd	aggaagcggaagaTAAACCATGGATTAAGCTTCCCG
pLacJB18_5_rev	gcggcgcgctctcTCCAGGTAGCGAAAGCCATTTTTTG
Del_ATG_fwd	TATAAGGATCCAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC
Del_ATG_rev	CAGATGGGTACCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCAT

Oligonukleotide zur Amplifikation von *mgfp6* ohne ATG-Start. Die *Bam*HI- und *Kpn*I-Erkennungssequenzen sind fett dargestellt.

Name	Sequenz (5'- 3')
gfpΔ_ATG_fwd	TATATGGATCCAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGA
gfpΔ_ATG_rev	AGATGGGTACCTTATTTGTATAGTTCATCC

Oligonukleotide zur Insertion der spezifischen Promotorsequenz in pLacZJB17 oder pLacZJB17Δ bzw. pLacZJB18 oder pLacZJB18Δ. Die *Nco*I- und *Bam*HI-Überhänge sind fett gedruckt. Die *Asc*I Erkennungssequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt.

Name	Sequenz (5'- 3')
FDX_fwd	CATGGggcgcgccCGGGCTTTCGTGGCAGTACGCTGGCCCGAACAGCAACTACTATGCGTTCGGAAGCCGAACCTCTGCAGTGG
FDX_rev	GATCCCACTGCAGAGTTCGGCTTCCGAACGCATAGTAGTTGCTGTTCGGGCCAGCGTACTGCCACGAAAGCCCCggcgcgccC
P2_fwd	CATGGggcgcgccCGATGCCCTTAAGTACAACAGGGTACTTTCGGTGGAATGCGAACGACAG
P2_rev	GATCCTGTGCTTCGCATTCCACCGAAGTACCCTGTTGTACTTAAGGGCATCGggcgcgccC
PA_fwd	CATGGggcgcgccTCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAAACCATACACATCCTTATGTGATGCCCCGAGTATAGTTAGAGATGGGTAAATCCCAGATACCAATGGCGCAACCAGATG
PA_rev	GATCCATCTGGTTGCGCCATTGGTGATCTGGGATTAACCCATCTCTAACTATACTCGGGCATCACATAAGGATGTGTATGGTTTCACCAGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAgcgcgccC

Material und Methoden

PO_fwd	CATGG ggcgcgccAAATAGAATCCGCGATCGACGACATGGAAGTCGCCCTTTCTTAAGATCCGGGGTC TCTACATAGAAGCATGGCAGATCCAGCAG
PO_rev	GATCCT GCTGGATCTGCCATGCTTCTATGTAGAGACCCCGGATCTTAAGAAAGGGCGACTTCCATG TCGTCGATCGCGGATTCTATTTggcgcgccC
PAoL_fwd	CATGG ggcgcgccTCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAAACCATACACATCCTTATGTGATGCC GAGTATAGTTAGAGATGGATGGCGCAACCAGATG
PAoL_rev	GATCC ATCTGGTTGCGCCATCCATCTCTAACTATACTCGGGCATCACATAAGGATGTGTATGGTTT CACCAGTCGTTATGTCTCTGTAATGAgcgcgccC
PDol_fwd	CATGG ggcgcgccATGGTTTCACCAGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAGTCGTACTTCTAAGTACGGAG AGTGTAAGCTTCTTAGACATGAGTTACCCCAATG
PDol_rev	GATCC ATTGGGTGAACTCATGTCTAAGAAGCTTTACACTCTCCGTACTTAGAAGTACGACTCATT CAGGAGACATAACGACTGGTGAAACCATggcgcgccC
PFoL_fwd	CATGG ggcgcgccTCTCCGGCGGCTGTTTGGGGCAGACCTGAGTCGGGTACAGTATACCCGCATTT AAATGACCTTGCAAGGTGACTTGAATGACTGAGAACCTAG
PF_oL_rev	GATCCT AGGTTCTCAGTCATTCAAGTACACCTTCGACTGCAAGGTCATTTAAATGCGGGTATACTG TACCCGACTCAGGTCTGCCCCAAACAGCCGCCGAGAgcgcgccC

Oligonukleotide zur Amplifikation der spezifischen Promotorsequenz. Die *Nco*I- und *Bam*HI-Erkennungssequenzen sind fett gedruckt. Die *Asc*I Erkennungssequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt.

Name	Sequenz (5'- 3')
PD_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccATGGTTTCACCAGTCGTTATGTC
PD_rev	TGATT GGATCC ATTGGGTGAACTCATTACTTCTCTC
PF_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccTCTCCGGCGGCTGTTTG
PF_rev	TGATT GGATCC TAGGTTCTCAGTCATTGGTCTCTCTCC

Oligonukleotide zur Amplifikation des Leserrahmens der verschiedenen Fluoreszenzproteine *Bam*HI und *Kpn*I-Erkennungssequenzen sind fett gedruckt.

Name	Sequenz (5'- 3')
mTagBFP_fwd	TACTAG GATCC ATGAGCGAACTGATCAAAGAGAACAT
mTagBFP_rev	ATCTAG GTACCG CGCCGCTTATTAAATTCAGTTTATGACCCAGCTTGCTAG
ecfp_fwd	TACTAG GATCC ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
ecfp_rev	AGCTAG GTACCG CGCCGCTTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGA
sfGFP_fwd	TACTAG GATCC ATGCGTAAAGGCGAAGAGCTGTT
sfGFP_rev	ATCTAG GTACCG CGCCGCTTTGTACAGTTCATCCATACCATGCGTG
eyfp_fwd	TACTAG GATCC ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
eyfp_rev	ATCTAG GTACCG CGCCGCTTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCC
SYFP2_fwd	TACTAG GATCC ATGGTTAGCAAGGGCGAAGAACTTTTT
SYFP2_rev	ATCTAG GTACCG CGCCGCTTATTATTTATACAGCTCATCCATACCCAGGGTAATAC
mcherry_fwd	TACTAG GATCC ATGGACGACCTCTTAGCGGAGCT
mcherry_rev	ATCTAG GTACCT CACTCATCCTGGGGCTG

Material und Methoden

Oligonukleotide zur Mutagenese von *smRS-gfp*. Die Substitutionen sind klein geschrieben.

Name	Sequenz (5'- 3')
mGFP_1_fwd	GATGCAACAaACGGAAAACCTTACCCTT
mGFP_1_rev	ACCTTCACCCTCTCCcCTGACAGA
mGFP_2_fwd	GTCACTACTcTCACCTTATGGTGTTTCGT
mGFP_2_rev	AGTGTTGGCCATGGAACAGGTA
mGFP_3_fwd	GTGTTCAATGCTTTgCAAGATACCCA
mGFP_3_rev	CATAAGTGAgAGTAGTGACAAGTGTTGGC
mGFP_4_fwd	CAACcCCCACAAaGTATACATCACG
mGFP_4_rev	TAGTTGTATTCCAACCTGTGGCCGA
mGFP_5_fwd	GAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGA
mGFP_5_rev	GAAAGcttAGATTGTGTGGACAGGTA
mGFP_6_fwd	GAGcgTGTAACtGCTGCTGGGATTA
mGFP_6_rev	tttAAGgACCATGTGGTCTCTCTTTTCG

Oligonukleotide zur Insertion der Sequenz der Gasvesikelpromotoren ohne die ersten 15 nt der jeweiligen Gene in pLacZJB18. Die *NcoI*- und *BamHI*-Überhänge sind fett gedruckt. Die *AscI*-Erkennungssequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt.

Name	Sequenz (5'- 3')
PA-Δ15_fwd	CATGG ggcgcgccTCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAAACCATACACATCCTTATGTGATGCCC GAGTATAGTTAGAGATGGGTAAATCCCAGATCACCAG
PA-Δ15_rev	GATCCTGGT GATCTGGGATTAACCCATCTCTAACTATACTCGGGCATCACATAAGGATGTGTATGG TTTACCAGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAgcgcgccC
PO-Δ15_fwd	CATGG ggcgcgccAAATAGAATCCGCGATCGACGACATGGAAGTCGCCCTTTCTTAAGATCCGGGGTC TCTACATAGAAGCG
PO-Δ15_rev	GATCCGCTT CTATGTAGAGACCCCGGATCTTAAGAAAGGGCGACTTCCATGTCGTCGATCGCGGAT TCTATTTggcgcgccC

Oligonukleotide zur Amplifikation der Gasvesikelpromotoren ohne die ersten 15 nt der jeweiligen Gene. Die *NcoI*- und *BamHI*-Erkennungssequenzen sind fett gedruckt. Die *AscI*-Erkennungssequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt.

Name	Sequenz (5'- 3')
PD-Δ15_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccTATGGTTTCACCAGTCGTTATGTC
PD-Δ15_rev	TGATT GGATCC ACTTCTCTCCAGTCGATGGCG
PF-Δ15_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccTCTCCGGCGGCTGTTTG
PF-Δ15_rev	TGATT GGATCCT AGGTTCTCAGTCATTGGTCTCTCTTC

Material und Methoden

Oligonukleotide zur Insertion der Sequenz von *P_{fdx}* und *P2* inklusive der ersten 15 nt des *fdx*-Gens und der 16S rRNA in pLacZJB18. Die *Nco*I- und *Bam*HI-Überhänge sind fett gedruckt. Die *Asc*I-Erkennungssequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt.

Name	Sequenz (5'- 3')
<i>P_{fdx}</i> +15_fwd	CATGG ggcgcgccCGGGCTTTCGTGGCAGTACGCTGGCCCGAACAGCAACTACTATGCGTTCGGAAGCCGAACCTGCAGTGATGCCGACGGTAGAAG
<i>P_{fdx}</i> +15_rev	GATCCTT CTACCGTCGGCATCACTGCAGAGTTCGGCTTCCGAACGCATAGTAGTTGCTGTTCGGGC CAGCGTACTGCCACGAAAGCCCCggcgcgccC
<i>P2</i> +15_fwd	CATGG ggcgcgccCGATGCCCTTAAGTACAACAGGGTACTTCGGTGGAATGCGAACGACAATGGGGC CGCCCGGTG
<i>P2</i> +15_rev	GATCC ACCGGGCGGCCCCATTGTCGTTCCGATTCCACCGAAGTACCCTGTTGTACTTAAGGGCATC GggcgcgccC

Oligonukleotide zur Amplifikation des *Spacer*-Bereichs zwischen *P_{fdx}* und t.L11e aus pTA1228. Die Erkennungssequenzen von *Nhe*I und *Nco*I sind fett gedruckt.

Name	Sequenz (5'- 3')
<i>Spacer</i> _fwd	TTAAT GCTAG CGCGCGTCAACGAGGGGTTTATCCACG
<i>Spacer</i> _rev	ATATAT CCATG GGGGTCAATCGGGTCGGTGGAGAGAAGAAA

Oligonukleotide zur Konstruktion von pLacZJB18+E. Die *Nhe*I- und *Xba*I-Erkennungssequenzen sind fett dargestellt.

Name	Sequenz (5'- 3')
FDX-gvpE_fwd	ATAGAG CTAGC CGGGCTTTCGTGGCAGTACGCTGGCCCGAACAGCAACTACTATGCGTTTCGGAAGCCGAACCTCTGCAGACTAGTATGGACGACCTCTTAGCGGAGC
FDX-gvpE_rev	GTGTAT CTAGA ATCACTCATCCTGGGGGCTGTG

Oligonukleotide zur Insertion der unterschiedlichen langen Bereiche der Promotorregion. Die Erkennungssequenzen von *Nco*I- und *Bam*HI-Überhängen sind fett gedruckt. Die *Asc*I Erkennungssequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt.

Name	Sequenz (5'- 3')
PA1_fwd	CATGG ggcgcgccCTCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAAACCATACACCGAGTATAGTTAGAGCATCCTTATGTGATGCATGGGTAAATCCCAGATCACCAATGGCGCAACCAGAG
PA1_rev	CTCTGGTTGCGCCATTGGTGATCTGGGATTAACCCATGCATCACATAAGGATGCTCTAACTATACTCGGTGTATGGTTTCACCAAGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAGggcgcgcc CCATG
PA2_fwd	CCATG GGGAGACATAACGACTGGTGAAACCATACACATCCTTATGTGATGCCCCGAGTATAGTTAGAGATGGGTAAATCCCAGATCACCAATGGCGCAACCAGATG
PA2_rev	CATCTGGTTGCGCCATTGGTGATCTGGGATTAACCCATCTCTAACTATACTCGGGCATCACATAAGGATGTGTATGGTTTCACCAAGTCGTTATGTCT CCCCATG

Material und Methoden

Oligonukleotide zur Amplifizierung der verschiedenen langen Promotorregionen. Die Erkennungssequenzen von *Nco*I- und *Bam*HI sind fett gedruckt. Die *Asc*I-Erkennungssequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt.

Name	Sequenz (5'- 3')
PDPA_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccTAGATTGGGTGAACTCATTA
PDPA_rev	TATAT GGATCC ATCTGGTTGCGCCATTGGTGA
PAPD_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccATCTGGTTGCGCCATTGGTGA
PAPD_rev	TATAT GGATCC ATTGGGTGAACTCATTACTTCTC
PD1_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccATGGTTTCACCAGTCGTTATGTCT
PD1_rev	TATAT GGATCC ATTGGGTGAACTCATTACTTCT
PD2_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccCCAGTCGTTATGTCTCCTGT
PD2_rev	TATAT GGATCC ATTGGGTGAACTCATTACTT

Oligonukleotide zur Amplifizierung der verschiedenen langen Promotorregionen ohne 5'-UTR. Die Erkennungssequenzen von *Nco*I- und *Bam*HI sind fett gedruckt. Die *Asc*I-Erkennungssequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt. Die ersten 15 nt des jeweiligen Gens sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5'- 3')
PDPA_oL_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccTAGATTGGGTGAACTCATTA
PDPA_oL_rev	TATAT GGATCC <u>ATCTGGTTGCGCCAT</u> CCATCTCTAACTATACTCGGGCAT
PAPDoL_fwd	TATAT CCATGG ggcgcgccATCTGGTTGCGCCATTGGTGA
PAPD_oL_rev	TATAT GGATCC <u>ATTGGGTGAACTCAT</u> TGTCTAAGAAGCTTTACACTCTCCGTA

Oligonukleotide zur Insertion der verschiedenen langen Promotorregionen ohne 5'-UTR. Die *Nco*I- und *Bam*HI-Überhänge sind fett gedruckt. Die *Asc*I-Erkennungssequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt. Die ersten 15 nt des jeweiligen Gens sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5'- 3')
PA2_oL_fwd	CATGG ggcgcgccGGAGACATAACGACTGGTGAAACCATACACATCCTTATGTGATGCCCCAGTATAGTTAGAGATGG <u>ATGGCGCAACCAGATG</u>
PA2_oL_rev	<u>CATCTGGTTGCGCCATCCATCTCTAACTATACTCGGGCATCACATAAGGATGTGTATGGTTTCACC</u> AGTCGTTATGTCTCCggcgcgcc CCATG
PD2_oL_fwd	CATGG ggcgcgccCCAGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAGTCGTACTTCTAAGTACGGAGAGTGTAAGCTTCTTAGAC <u>ATGAGTTCACCCAATG</u>
PD2_oL_rev	<u>CATTGGGTGAACTCAT</u> TGTCTAAGAAGCTTTACACTCTCCGTACTTAGAAGTACGACTCATTACAGGAGACATAACGACTGGggcgcgcc CCATG

Material und Methoden

Oligonukleotide zur Insertion der veränderten 5'-UTR_D-Sequenzen. Die *Hind*III- und *Bam*HI-Überhänge sind fett gedruckt.

[illegible]

Oligonukleotide zur Generierung von pLacZJB19.

Name	Sequenz (5'- 3')
pLacJB19_1_fwd	AAAAGGAATTCCACTGCAGAG
pLacJB19_1_rev	tctgcagtggaattccttttGGATCCATGACAGTTGGTG
pLacJB19_2_fwd	cgtgacagccGAACTCGTTGTCAGTCTG
pLacJB19_2_rev	caacgagttcGGCTGTCACGAGACGGTTAC
pLacJB19_3_fwd	gatgcttgcgGGTATCCGCGGTCCGGAG
pLacJB19_3_rev	cgcgataaccGCGAAGCATCGACCGCCG
pLacJB19_4_fwd	gttctctctttcagatgggtaccGGTACCTCACTCGGACGCG
pLacJB19_4_rev	GGTACCCATCTGAAAGGAGGAACTATATCC

Material und Methoden

Oligonukleotide zur Deletion des ATG-Startes des *bgaH*-Leserahmens in pLacZJB19.

Name	Sequenz (5'- 3')
ΔATG-bagH_fwd	ACAGTTGGTGTCTGCTATTTCCCGGAGCACT
ΔATG-bagH_rev	GGATCCTTATTTTGTACACCAGACCAACTGGTAATG

Oligonukleotide zur Insertion der konstanten Region und der jeweiligen Riboswitches in pLacZJB19. Die *EcoRI*- und *BamHI*-Überhänge sind fett gedruckt.

Name	Sequenz (5'- 3')
RA_fwd	AATTC CATACGACTCACTATAGGTTCCGGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCTGA GAAGGGGCAACAAGATGG
RA_rev	GATCCC ATCTTGTTGCCCTTCTCAGGTGCTGCCAAGGGCATCAAGACGATGCTGGTATCACCGAA CCTATAGTGAGTCGTATC
RB_fwd	AATTC CATACGACTCACTATAGGTTCCGGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCCG CTGCGCAGGGGGTATCAACAAGATGG
RB_rev	GATCCC CATACGACTCACTATAGGTTCCGGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCTG AGAAGGGGCAACAAGATGGGATCC
RC_fwd	AATTC CATACGACTCACTATAGGTTCTGATAAGATAGGGGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCT TGGCAGCACCAAGGGACAACAAGATGG
RC_rev	GATCCC ATCTTGTTGTCCCTTGGTGCTGCCAAGGGCATCAAGACGATGCTGGTATCACCCCTATCT TATCAGGAACCTATAGTGAGTCGTATC
RD_fwd	AATTC CATACGACTCACTATAGGTTCCGGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCCCT GCTAAGGTAACAACAAGATGG
RD_rev	GATCCC ATCTTGTTGTTACCTTAGCAGGGTGCTGCCAAGGGCATCAAGACGATGCTGGTATCACCG GAACCTATAGTGAGTCGTATC
RE_fwd	AATTC CATACGACTCACTATAGGTTCCGGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCCCT GCTAAGGAGGTAACAACAAGATGG
RE_rev	GATCCC ATCTTGTTGTTACCTCCTTAGCAGGGTGCTGCCAAGGGCATCAAGACGATGCTGGTATCA CCGGAACCTATAGTGAGTCGTATC
RE*_fwd	CATGG ATACGACTCACTATAGGTTCCGGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCCCT GCTAAGGAGGCAACAAGATGG
RE*_rev	GATCCC ATCTTGTTGCCTCCTTAGCAGGGTGCTGCCAAGGGCATCAAGACGATGCTGGTATCACCG GAACCTATAGTGAGTCGTATC
CAA_fwd	CATGG ATACGACTCACTATAGGTTCCCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACACT GCTAAGGAGGCAACAAGATGG
CAA_rev	GATCCC ATCTTGTTGCCTCCTTAGCAGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGGG AACCTATAGTGAGTCGTATC

Oligonukleotide zur Deletion des ATG-Starts von *c-gypE* in pPDPA+E

Name	Sequenz (5'- 3')
ΔATG-E_fwd	GACGACCTCTTAGCGGAGCTCAA
ΔATG-E_rev	ACTAGTCTGCAGAGTTCGGCTTCC

Oligonukleotide zur Insertion der *EcoRI*-Schnittstelle in pPDPA+EA. Die *EcoRI*-Schnittstelle ist fett gedruckt. Spacer zwischen den Erkennungssequenzen von *EcoRI* und *SpeI*.

Name	Sequenz (5'- 3')
EcoRI_fwd	GAATTC <u>TATATA</u> AACTAGTGACGACCTCTTAGCGG
EcoRI_rev	ACTAGTCTGCAGAGTTCGGCTTCC

Material und Methoden

Oligonukleotide zur Insertion von Riboswitch E in pPDPAJB18+EA-*EcoRI*. Die *EcoRI*- und *SpeI*-Überhänge sind fett gedruckt.

Name	Sequenz (5'- 3')
RE_fwd	AATTC ATACGACTCACTATAGGTTCCGGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCCCT GCTAAGGAGGTAACAACAAGATGA
RE_rev	GATCA CATCTTGTGTGTTACCTCCTTAGCAGGGTGCTGCCAAGGGCATCAAGACGATGCTGGTATC ACCGGAACCTATAGTGAGTCGTATC

3.1.6. Verwendete Größenstandards

DNA	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix #SM0331	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Protein	Hersteller
Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

3.1.7. Verwendete Vektoren

Vektor	Resistenz	Referenz
pLacZ-smRSGFP	(Ampicillin ^R , Lovastatin ^R)	unveröffentlicht
pWL102	(Ampicillin ^R , Lovastatin ^R)	(Lam and Doolittle, 1989)
pJAS35	(Ampicillin ^R , Novobiocin ^R)	(Pfeifer et al., 1993b)
puc19	(Ampicillin ^R)	New England Biolabs GmbH

3.1.8. Verwendete Mikroorganismen

<i>Escherichia coli</i>	Relevanter Genotyp	Referenz
TOP10 ⁷	F' [<i>lacI</i> ^q , <i>Tn10</i> (Tet ^R)] <i>mcrA</i> <i>Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80lacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697</i> <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen Corporation, USA
<i>Haloferax volcanii</i>	Relevanter Genotyp	Referenz
WFD11	Deletion von Plasmid pHV2	Cline <i>et al.</i> , 1989
WR340	His ⁻	Bitan-Banin <i>et al.</i> , 2003
H1224	<i>ΔpyrE ΔhdrB nph-pitA Δmrr cdc48d-Ct</i>	Stound <i>et al.</i> , 2012

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Transformation und Kultivierung von *E. coli*

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA oder Ligationsprodukten wurden chemisch kompetente Zellen einer Hitzeschocktransformation nach Sambrook et al., 1989 unterzogen. Dazu wurden 2 µl Plasmidlösung bzw. 20 µl Ligationsansatz zu 50 µl *E. coli* Top10 F' Zellen (zuvor auf Eis aufgetaut) gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 60 s. Im Anschluss wurden die Ansätze für 2 min auf Eis abgekühlt. Die Regeneration der Zellen erfolgte in 800 µl LB-Medium bei 37 °C und 500 rpm. Im Fall von Plasmid-DNA wurden 50 µl der Suspension auf LB-Festmedium mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Bei der Transformation von Zellen mit Ligationsprodukten wurden die Ansätze bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die sedimentierten Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert und die Suspension anschließend auf LB-Festmedium mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Für molekularbiologische Zwecke wie DNA-Isolierungen erfolgte die Anzucht von *E. coli* Zellen in 5 ml LB-Flüssigmedium (+100 µg/ml Ampicillin) bei 180 rpm und 37 °C für 12 h.

LB-Medium für *Escherichia coli* (Luria-Bertani-Broth)

	10%	Bacto-Trypton
	0,5%	Bacto-Hefeextrakt
	1%	Natriumchlorid
	pH 7,2; autoklavieren	
Festmedium:	+ 1,5%	Bacto-Agar
Selektivmedium:	+ 100 µg/ml	Ampicillin

3.2.2. Herstellung chemisch-kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode

Die Permeabilisierung der Bakterienmembran zur Hitzeschocktransformation von *E. coli* Top10 F' Zellen erfolgte durch Behandeln der Zellen mit Rubidiumchlorid. Dazu wurden im Vorfeld *E. coli* Top10 F' Zellen auf LB-Festmedium mit 12,5 µg/µl Tetrazyklin ausgestrichen und für 12 h bei 37 °C inkubiert. Von den resultierenden Kolonien wurde eine Kolonie in 2,5 ml SOB-Medium transferiert und die Zellen in Flüssigkultur bei 37 °C und 180 rpm für 12 Stunden angezogen. Mittels der Vorkultur wurden im Anschluss 250 ml PSI-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft und die Kultur bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch eine Zentrifugation bei 4.000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde entfernt und das Zellsediment in 100 ml TFB1-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 5.000 rpm für 5 min. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt, die sedimentierten Zellen in 2 ml TFB2-Lösung aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

Super Optimal Broth (SOB) Medium

0,5% Bacto-Hefeextrakt
2% Bacto-Trypton
10 mM Natriumchlorid
2,5 mM Kaliumchlorid
autoklavieren

PSI Medium

2% Bacto-Trypton
0,5% Magnesiumsulfat

pH 7,6
autoklavieren

TFB 1

30 mM Kaliumacetat
100 mM Kalziumchlorid
100 mM Rubidiumchlorid
50 mM Manganchlorid
15% Glycerin (v/v)

pH 5,8
sterilfiltrieren

TFB2

10 mM MOPS
75 mM Kalziumchlorid
50 mM Manganchlorid
15% Glycerin (v/v)

pH 6,5
sterilfiltrieren

3.2.3. Transformation und Kultivierung von *Hfx. volcanii*

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in *Hfx. volcanii* wurde ähnlich wie in Pfeifer and Ghahraman; 1993 beschrieben, durchgeführt. Zur Transformation wurden *Hfx. volcanii* Zellen auf Festmedium ausgestrichen und bei 42 °C für 2 Tage unter feuchten Bedingungen kultiviert. Im Anschluss wurde eine Kolonie in 5 ml Flüssigmedium transferiert und die Flüssigkultur bei 42 °C für 24 h inkubiert. Mittels der Vorkultur wurden 5 ml 3 M Vollmedium auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,02 beimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte zwischen 0,2 und 0,4 bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Zur Sphäroplastierung der Zellen wurden 2 ml der Kultur bei 8.000 x g für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 100 µl 1 M Sphäroplastierungslösung resuspendiert und 10 µl 1 M Sphäroplastierungslösung + 0,5 M EDTA zugegeben. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurden pro Ansatz circa 500 ng Plasmid (1 – 2 µl) und 22 µl Sphäroplasten für weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurden je Transformationsansatz mit 23 µl 60% PEG₆₀₀ in 1 M Sphäroplastierungslösung versetzt, sofort intensiv gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Regeneration der Zellen erfolgte durch Zugabe von 950 µl des entsprechenden Mediums supplementiert mit 15% Saccharose bei 42 °C über Nacht. Im Anschluss wurden die Ansätze bei 8.000 x g für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 150 µl resuspendiert, die Zellen auf Festmedium (mit 6 µg/ml Lovastatin) ausplattiert und in feuchter Atmosphäre bei 42 °C für 5 bis 7 Tage inkubiert. Im Fall von Transformanten, die das *bgaH*-Gen exprimierten, wurde dem Festmedium zusätzlich X-Gal (Endkonzentration: 20 µg/ml) hinzugegeben. Zur Anzucht der resultierenden Transformanten wurde das jeweilige Medium mit 6 µg/ml Lovastatin supplementiert.

Im Fall von *Hfx. volcanii* WFD11 und WR340 wurde 3 M Vollmedium verwendet, während *Hfx. volcanii* H1224 in Hv-Ca Medium mit 40 µg/ml Thymidin und 50 µg/ml Uracil kultiviert wurde.

Zur Kultivierung von Transformanten wurde dem Flüssigmedium 6 µg/ml Lovastatin hinzugefügt. Die Anzucht von *Hfx. volcanii* zur Herstellung kompetenter Zellen erfolgte ohne Antibiotikum.

Material und Methoden

3 M Vollmedium für *Hfx. volcanii* WFD11 und WR340

	3 M	Natriumchlorid
	150 mM	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
	50 mM	Kaliumchlorid
	10 mM	Manganchlorid
	3 mM	Calciumchlorid-Dihydrat
	25 mM	Tris-HCl; pH 7.2
	0,5% (w/v)	Bacto-Trypton
	0,3% (w/v)	Oxid-Hefeextrakt
	0,02% (w/v)	L-Histidinhydrochlorid-Monohydrat
	pH 7,2	
	autoklavieren	
Festmedium:	+ 1,8%	Bacto-Agar
Selektivmedium:	+ 6 µg/ml	Lovastatin

Hv-Ca Medium für *Hfx. volcanii* H1224

	2,5 M	Natriumchlorid
	85 mM	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
	56 mM	Kaliumchlorid
	88,5 mM	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
	12 mM	Tris-HCl; pH 7.5
	3 mM	Calciumchlorid-Dihydrat
	0,5% (w/v)	Casaminoacids
	40 µg/ml	Thymidin
	50 µg/ml	Uracil
	pH 7,2	
	autoklavieren	
Festmedium:	+ 1,8%	Bacto-Agar
Selektivmedium:	+ 6 µg/ml	Lovastatin

1 M Sphäroplastierungslösung

	15% (w/v)	Sucrose
	1 M	Natriumchlorid
	27 mM	Kaliumchlorid
	50 mM	Tris
	sterilfiltrieren	

3.2.4. Wachstumskurven von Haloarchaea

Zur Herstellung von Wachstumskurven von *Hfx. volcanii* wurden 50 ml des jeweiligen Mediums auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 (Vorkultur OD_{600nm} von 0,6) beimpft und bei 42 °C und 180 rpm bis zum Erreichen der späten stationären Phase inkubiert. Die Messung der optischen Dichte bei 600 nm erfolgte über den gesamten Wachstumsverlauf der Kultur zu bestimmten Zeitpunkten. Zur Auswertung wurden die gemessenen Werte halblogarithmisch in ein Diagramm eingetragen.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten und erfolgte nach Saiki *et al.* (1988). Zur Klonierung *via* Restriktion wurden die Erkennungssequenzen spezifischer Restriktionsschnittstellen über die verwendeten Oligonukleotidpaare in die resultierenden DNA-Fragmente gebracht. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie die Reaktionsparameter sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der PCR-Ansätze und Reaktionsparameter.

Endkonzentration	Substanz	Temperatur	Dauer	Zyklen
2 - 4 ng	Matrizen-DNA	98°C	2 min	1
1 x	5 x Reaktionspuffer	98 °C	30 sec	30
0,25 mM	dNTP-Mix (je dNTP 2,5 mM)	TM*	30 sec	
0,4 pmol	Oligonukleotid Forward	72 °C	30 sec/kb	
0,4 pmol	Oligonukleotid Reverse	72 °C	2 min	1
1 U	Q5-Polymerase	4 °C	∞	
ad 50 µl	ddH ₂ O			

* Mittelwert der Schmelztemperaturen der jeweiligen Oligonukleotidpaare

3.3.2. Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion

Die Kontrolle von *E. coli* und *Hfx. volcanii* Transformanten auf die Aufnahme eines gewünschten Plasmids erfolgte mittels Kolonie-PCR. Dazu wurde Zellmaterial von den entsprechenden Kolonien in 50 µl ddH₂O transferiert und von der Suspension 1 µl als Matrize zu dem jeweiligen Reaktionsansatz gegeben. Die Zusammensetzung der Kolonie-PCR-Ansätze sowie die Reaktionsparameter sind in **Tabelle 2** dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Kolonie-PCR-Ansätze und Reaktionsparameter.

Endkonzentration	Substanz	Temperatur	Dauer	Zyklen
1 µl	DNA-Verdünnung	95°C	10 min	1
1 x	10 x Reaktionspuffer	95 °C	10 min	30
0,1 mM	dNTP-Mix (je dNTP 2,5 mM)	TM*	1 min	
1 pmol	Oligonukleotid Forward	72 °C	1 min	
1 pmol	Oligonukleotid Reverse	72 °C	5 min	1
0,625 U	Taq-Polymerase	4 °C	∞	
ad 25 µl	ddH ₂ O			

* Mittelwert der Schmelztemperaturen der jeweiligen Oligonukleotidpaare

3.3.3. Mutagenese-PCR

Die ortsspezifische Mutagenese-PCR ermöglicht es, die Sequenz von Genen oder DNA-Abschnitten zu verändern, indem die verwendeten Oligonukleotide die gewünschte Substitution enthalten. Die Mutagenese erfolgt durch eine komplette Amplifizierung eines Matrizen-Vektors, der die zu modifizierende DNA enthält und zwei, sich am 5'-Ende flankierende Oligonukleotide, von denen eines oder beide über die gewünschte Substitution verfügt. Die resultierenden linearen Vektoren besitzen den mutierten Sequenzabschnitt und liegen mit glatten Enden vor. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie die Reaktionsparameter sind in **Tabelle 3** dargestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Mutagenese-PCR Ansätze und Reaktionsparameter.

Endkonzentration	Substanz	Temperatur	Dauer	Zyklen
50 ng	Matrizen-DNA (Plasmid)	98°C	2 min	1
1 x	5 x Reaktionspuffer	98 °C	30 sec	30
0,25 mM	dNTP-Mix (je dNTP 2,5 mM)	TM*	30 sec	
0,4 pmol	Oligonukleotid Forward	72 °C	30 sec/kb	
0,4 pmol	Oligonukleotid Reverse	72 °C	2 min	1
1 U	Q5-Polymerase	4 °C	∞	
ad 50 µl	ddH ₂ O			

* Mittelwert der Schmelztemperaturen der jeweiligen Oligonukleotidpaare

Die anschließende Entfernung der Plasmide, die als Matrize zu den PCR-Ansätzen gegeben wurden, erfolgte mittels des methylierungsabhängigen Restriktionsenzym *DpnI*. Dazu wurde zu jedem PCR-Produkt 5 U *DpnI* gegeben und die Ansätze für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zum Ringschluss der linear vorliegenden Amplifikate wurden die Ansätze gereinigt und anschließend zu 16 µl PCR-Produkt 2 µl T4-Ligase Puffer, 10 U T4-Polynukleotidkinase und 400 U T4-Ligase gegeben. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 2 h wurden *E. coli* Top 10F' Zellen mit den resultierenden Plasmiden transformiert.

3.3.4. Reinigung von DNA

Zur Reinigung von PCR-Produkten oder restringierten Amplifikaten wurde das GeneElute™ PCR Clean-Up Kit der Firma SIGMA verwendet. Die Reinigung von restringierten Plasmiden erfolgte mittels des Kits DNA Clean & Concentrator-5 der Firma Zymo Research. In allen Fällen wurde nach Herstellerangaben verfahren.

3.3.5. Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Übernachtskulturen) erfolgte mittels E.Z.N.A™ Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol der Firma OMEGA. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

3.3.6. Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zur Vorbereitung von Klonierungen (quantitativer Restriktionsansatz) oder zur Kontrolle von Plasmiden (analytischer Restriktionsansatz) wurde doppelsträngige DNA mittels Endonukleasen fragmentiert. Die eingesetzte Enzymmenge (Units) sowie die Reaktionsparameter wurden dem entsprechenden Enzym laut Herstellerangaben angepasst.

3.3.7. Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung einer Rezirkulation des linearisierten Plasmids wurde direkt zu quantitativen Restriktionsansätzen von Plasmiden 1 U Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) gegeben. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Herstellerangaben gewählt.

3.3.8. Phosphorylierung von DNA

Die Phosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels T4-Polynukleotidkinase (PNK). Hybridisierte Oligonukleotide wurden mit 10 U PNK, 1 x Ligasepuffer und 10 U PNK bei 37 °C für 1 bis 2 h inkubiert und anschließend die PNK bei 65 °C für 15 min hitzeinaktiviert.

3.3.9. Ligation

Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente erfolgte mittels Ligation bei 25 °C innerhalb von 2 h oder bei 16 °C über Nacht. Zur Reduzierung des Reaktionsvolumens wurden die Ansätze mit 5% Polyethylenglycol₆₀₀ (PEG₆₀₀). Als molares Verhältnis von Insert zu Vektor wurde 5 zu 1 gewählt und mittels der folgenden Formel bestimmt:

$$\frac{5 * \text{Menge Vektor [ng]} * \text{Länge Insert[bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}}$$

3.3.10. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten unter 120 bp wurden Oligonukleotide zu doppelsträngige DNA hybridisiert. Die verwendeten Oligonukleotide waren komplementär zu dem gewünschten DNA-Bereich (*sense* und *antisense* Strang) und enthielten Nukleotidüberhänge der zu verwendeten Restriktionsendonukleasen. Die resultierende doppelsträngige DNA verfügte somit über passgenaue Nukleotidüberhänge zu den Restriktionsschnittstellen des Zielvektors. Zur Hybridisierung wurden je Oligonukleotid 100 µM im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und langsam bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die resultierenden DNA-Fragmente phosphoryliert und über Ligation in den entsprechenden Vektor inseriert.

3.3.11. Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren in Lösung erfolgte photometrisch bei 260 nm mittels des Nanodrop® Spectrophotometers ND1000 von PegaLab. Um Aussagen über die Reinheit der Probe zu treffen, wurde das Verhältnis zwischen den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Wert 260/280 sollte bei DNA zwischen 1,6. und 1,9 liegen. Während höhere Werte auf einen Abbau der Nukleinsäuren deuten, sind niedrigere Werte auf die Anwesenheit von Proteinen oder Phenol zurückzuführen. Eingesetzt wurden 1 µl Ansatz. Als Leerwert diente Wasser.

3.3.12. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde mittels des Kettenabbruchverfahrens von dem „Sequencing Service“ (LMU Biozentrum, Martinsried), der SeqLab Sequence Laboratories GmbH (Göttingen) oder Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg) durchgeführt.

3.3.13. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Dazu wurden die Ansätze mit 10 x Auftragspuffer versetzt und die DNA-Fragmente in einem 1%-igen TAE-Agarosegel (w/v) bei 8–10 V/cm Gellänge in 0,5 x TAE-Puffer separiert. Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Agarosegel für 10 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in H₂O) inkubiert und anschließend für 10 min in H₂O entfärbt. Die Detektion erfolgte durch die Anregung des Ethidiumbromids mit einer Wellenlänge von 312 nm (Sambrook and Russell, 2001).

50 x TAE

50 mM	EDTA
2 mM	Tris/Acetat; pH 8,0

10 x Auftragspuffer

0,25% (w/v)	Bromphenolblau
50% (w/v)	Saccharose
0,1 M	EDTA
ad 1 x	TE-Puffer; pH 8,0
pH 6,5	
sterilfiltrieren	

1x TE-Puffer

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
pH 8,0	
autoklavieren	

3.4. Fluoreszenzanalysen

3.4.1. Fluoreszenzmessung bei *Hfx. volcanii*

Zur Quantifizierung des Fluoreszenzsignals *in vivo* wurden 5 ml 3 M Vollmedium mit einer Vorkultur der jeweiligen *Hfx. volcanii* Zellen auf eine OD₆₀₀ von 0,02 angeimpft und bei 42 °C und 180 U/min bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3; 0,6; 1,2 und 3,0 (Inkubationszeit: 16, 24, 36 und 48 h) kultiviert. Anschließend nach den jeweiligen Zeitpunkten je Kultur 1 ml Suspension entnommen und bei 5.000 x g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit Salzwasser gewaschen, final in 2 ml Salzwasser resuspendiert und die Fluoreszenz der Zellen im Fluorolog FL3-22 von Horiba Jobin Yvon bei 25°C gemessen. Die verwendeten Exzitations- sowie Emissionswellenlänge der verschiedenen Fluoreszenzproteine befindet sich in **Tabelle 4**. Als Spaltgröße wurden 5 nm gewählt. Die Integrationszeit betrug 0,5 s. Nach der Fluoreszenzbestimmung wurde die Zellsuspension gemischt und die optische Dichte bestimmt. Zur Normierung der gemessenen Fluoreszenzwerte wurden diese durch die Zellzahl dividiert. Die Autofluoreszenz der *Hfx. volcanii* Wildtyp-Zellen wurde von den Daten subtrahiert. Jedes Experiment wurde in Triplikaten mit drei biologischen Replikaten durchgeführt.

Tabelle 4: Exzitations- und Emissionswellenlängen zur Messung der verschiedenen Fluoreszenzproteine.

Fluoreszenzprotein	Exzitation [nm]	Emission [nm]
mTaqBFP2	399	454
GFP-Varianten	488	509
YFP-Varianten	515	528
mCherry	587	610

Salzwasser

3 M	Natriumchlorid
150 mM	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
50 mM	Kaliumchlorid
10 mM	Manganchlorid
3 mM	Calciumchlorid-Dihydrat
25 mM	Tris-HCl; pH 7.2
0,02% (w/v)	L-Histidinhydrochlorid-Monohydrat
pH 7,2	

3.4.2. Fluoreszenzmikroskopie

Die Visualisierung von *Hfx. volcanii* Transformanten erfolgte im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS SP5 II (CLSM) in Kombination mit der Leica Anwendungssoftware. Zur Mikroskopie wurde 1 ml Kultur bei Raumtemperatur und 8.000 rpm für 2 min zentrifugiert, der Überstand entfernt, die sedimentierten Zellen in 500 µl Salzwasser resuspendiert und von der Zellsuspension 10 µl mikroskopiert. Die verwendete Exzitations- sowie Emissionswellenlänge der verschiedenen Fluoreszenzproteine ist in **Tabelle 5** dargestellt. Die Bildbearbeitung erfolgte mittels ImageJ.

Tabelle 5: Exzitations- und Emissionswellenlängen der verschiedenen Fluoreszenzproteine.

Fluoreszenzprotein	Exzitation [nm]	Laser	Emission [nm]
mTaqBFP2	405	405 Diode/UV	430 - 480
GFP-Varianten	488	Argon	500 - 550
YFP-Varianten	488	Argon	510 - 570
mCherry	633	HeNe	600 - 650

3.5. Proteinchemische Methoden

3.5.1. Gewinnung von Gesamtzelllysat aus *Hfx. volcanii*

Zur Gewinnung von Gesamtzelllysat aus *Hfx. volcanii* wurden 50 ml 3 M Vollmedium (+ 6 µg/ml mit 100 µl) mit einer Vorkultur der zu untersuchenden Transformante (OD₆₀₀ von 0,6) beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,2 bei 42 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 2.000 x g für 45 min. Anschließend wurde das Zellsediment in 2 -3 ml Lysepuffer resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall auf Eis (2x 5 min, Branson-Sonator 250, 3 mm Disruptorhorn) aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 2.000 x g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand zur Entfernung des hohen Salzgehaltes für 12 h gegen 10 mM Tris-HCl (pH 7,2) dialysiert.

3.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Bradford-Methode (Ausubel et al., 1989). Dazu wurde zu Beginn eine Eichgerade mit 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/mL Rinderserumalbumin erstellt. Von den jeweiligen Konzentrationen wurden 20 µl zu 980 µl Bradford-Reagenz pipettiert, die Absorption nach 5 min bei 595 nm gemessen und mit den erhaltenen Werten eine Eichgerade erstellt. Anhand der Steigung der Gerade wurde der Bradford-Faktor bestimmt. Die Durchführung zur Bestimmung der Proteinkonzentration des Gesamtzelllysates erfolgte wie bei der Erstellung der Eichgerade beschrieben. Bei einer optischen Dichte über 1,0 wurden die Ansätze verdünnt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der im Folgenden aufgeführten Formel berechnet:

$$\text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]: \text{OD}_{595 \text{ nm}} \times F_V \times F_B$$

OD_{595 nm}: gemessene Absorption bei 595 nm

F_V: Verdünnungsfaktor

F_B: Bradfordfaktor

Bradford-Reagenz

0,01% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G 250
4,75% (v/v)	Ethanol (100%)
8,50% (v/v)	ortho-Phosphorsäure (85%)

3.5.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger

Die Auftrennung des Zelllysats von *Hfx. volcanii* erfolgte mittels eines 12%-igen SDS-Polyacrylamid Gels nach Schägger (Schägger and von Jagow, 1987). Dazu wurden 20 μg Zelllysats mit 6 μl SDS-Auftragspuffer versetzt und die Ansätze mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 μl gebracht. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Ansätze für 5 min bei 95 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte 1,5 Stunden bei 120 mV. Als Marker diente der Fisher BioReagentsTM EZ-RunTM Prestained Rec Protein Ladder. Im Folgenden ist die Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele aufgelistet.

Substanzen	Sammelgel (4%)	Trenngel (12%)
30% (w/v) Acrylamid	2 ml	14,4 ml
3x Gelpuffer	3,5 ml	12 ml
25% (v/v) Glycerin	-	9,6 ml
ddH ₂ O	9 ml	-
10% (w/v) APS	200 μl	276 μl
TEMED	40 μl	53 μl

3.5.4. Western Analyse

Zum immunologischen Nachweis von cGvpE in *Hfx. volcanii* wurde das Zelllysats der zu untersuchenden Zellen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Roti®-Fluoro PVDF, Carl Roth) transferiert. Um Detergenzien und Salze zu entfernen, wurde das SDS-Gel im Vorfeld für 40 min in Kathodenpuffer inkubiert. Zur Aktivierung der PVDF-Membran wurde diese für 3 min in Methanol (100%) inkubiert, mit ddH₂O gewaschen und anschließend für 10 min in Anodenpuffer 2 eingelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte mittels PerfectBlueTM "Semi-Dry"-Blotter bei 2 mV/m² innerhalb 30 min. Im Folgenden ist der Aufbau des *Semi-Dry-Blot*-Systems dargestellt.

Kathode	Puffer
3x Filterpapier	Kathodenpuffer
SDS-Polyacrylamidgel	Kathodenpuffer
PVDF-Membran	MeOH dH ₂ O, Anodenpuffer 2
2x Filterpapier	Anodenpuffer 2
1x Filterpapier	Anodenpuffer 1
Anode	

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert, in 100% Methanol reaktiviert, 4 min in PBS eingelegt und 1 h mit Odyssey Blocking Buffer (LI-COR) blockiert. Die Membran wurde über Nacht mit GvpE-Antiserum (1:1000 in Odyssey Blocking Buffer) inkubiert. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurde die Membran viermal für 5 min mit PBS + 0,1% (v/v) Tween® 20 gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran mit dem an einem Fluorophor gekoppelten Sekundärantikörper IRDye 800CW (1:25000 in Odyssey Blocking Buffer) für eine Stunde. Die Membran wurde erneut viermal für 5 min mit PBS + 0,1% (v/v) Tween® 20 gewaschen und final dreimal für 10 min in PBS ohne Tween inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Odyssey Fc Imager (LI-COR) bei 800 nm.

Material und Methoden

1 x PBS		Kathodenpuffer	
137 mM	Natriumchlorid	30 mM	ε-Amino-Caprone Säure
2,7 mM	Kaliumchlorid	0,05% (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
10 mM	Dinatriumhydrogenphosphat	10% (v/v)	Methanol
2 mM	Kaliumdihydrogenphosphat		

Anodenpuffer 1		Anodenpuffer 2	
0,3 M	Tris	25 mM	Tris
10% (v/v)	Methanol	10% (v/v)	Methanol

Blocking Reagenz
Odyssey Blocking Buffer

3.5.5. Bestimmung der BgaH-Aktivität mittels ONPG Test

Die Messung der Aktivität der halophilen β-Galaktosidase (BgaH) aus *Hfx. lucentense* erfolgte mittels des ONPG Tests. Der Test beruht auf der β-glykosidischen Spaltung des farblosen ONPG (ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid) zu Galaktose und o-Nitrophenol (ONP), was einen gelben Farbumschlag zur Folge hat. Die Intensität der Färbung ist von der Menge der gebildeten BgaH Moleküle sowie der Reaktionsdauer abhängig und kann bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt werden. Zur Bestimmung der BgaH-Aktivität wurden 50 ml Vollmedium mit einer Vorkultur der jeweiligen *Hfx. volcanii* Transformante (OD₆₀₀ von 0,6) auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,02 beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 bis 1,2 bei 180 rpm und den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Der Salzgehalt des Mediums sowie die Inkubationstemperatur der Transformanten variierte innerhalb der verschiedenen Versuche. Zu Beginn wurde die optische Dichte der jeweiligen Kultur bestimmt und zur anschließenden Zellernte 1 ml Suspension bei 5.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 300 µl Aufschlusspuffer aufgenommen und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Daraufhin wurden die einzelnen Ansätze in je eine Küvette transferiert und mit 700 µl ONPG-Testpuffer versetzt. Nach einer Inkubation zwischen 30 min und 4 Stunden bei 37 °C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 µl 0,5 M EDTA gestoppt und anschließend die Absorption bei 420 und 550 nm bestimmt. Die Miller Units wurden mittels der folgenden Formel berechnet:

$$1 \text{ Miller Unit} = \frac{1000 * Abs_{420} - (1,75 * Abs_{550})}{t * v * Abs_{600}}$$

Abs₄₂₀: Absorption ONP, Abs₅₅₀: Streuung der Zelltrümmer, t: Reaktionszeit [min], v = eingesetztes Kulturvolumen [ml], Abs₆₀₀: optische Dichte

Aufschlusspuffer		ONPG-Testpuffer	
2,5 M	Natriumchlorid	2,5 M	Natriumchlorid
10 µM	Manganchlorid	10 µM	Manganchlorid
50 mM	Tris-HCl; pH 7,2	50 mM	Tris-HCl; pH 7,2
0,1%	TritonX-100	0,1%	beta-Mercaptoethanol
1 mg/ml	DNase	2 mg/ml	ONPG

4. Ergebnisse

Die Expression vieler haloarchaealer Gene ist von verschiedenen Umweltbedingungen abhängig (Pfeifer, 2015). Durch die Regulation der Transkription und Translation kann die Zelle auf unterschiedliche Umweltveränderungen reagieren. Für Haloarchaea stehen nur wenige Reportersysteme zur Verfügung, um regulatorische genetische Elemente (wie bspw. Promotoren, untranslatierte Bereiche, Riboswitche oder sRNAs) zu charakterisieren. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit das unter hypersalinen Bedingungen funktionsfähige smRS-GFP optimiert und ein haloarchaeales GFP-Reportersystem generiert (**Kapitel 4.1**). Zur Validierung des GFP-Reportersystems wurden diverse haloarchaeale Promotoren charakterisiert und die Regulation der p-vac-Region weiter untersucht (**Kapitel 4.2**). Im Fokus standen 5'-UTRs, die ersten 15 nt der p-gvp-Gene sowie die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} .

Wie im Fall von Reportersystemen sind in der Literatur auch nur wenige induzierbare Expressionssysteme für Haloarchaea bekannt. Diese Systeme erlauben eine gezielte zeitliche Steuerung der Genexpression, wodurch die Funktionalität eines Genprodukts charakterisiert werden kann. Darüber hinaus wird die konditionale Synthese von Regulatorelementen ermöglicht, was zur Charakterisierung des jeweiligen Regulatorelements dient. Mit bereits etablierten Regulatorelementen (z. B. Transkriptionsaktivatoren oder -inhibitoren) in Verbindung mit einem induzierbaren Reportersystem können komplexe genetische Schaltkreise „programmiert“ werden. In Kombination mit GFP als Reporter kann so die Auswirkung einzelner Regulatoren oder Regulatorelemente auf die Promotoraktivität oder generell der Transkription oder Translation direkt *in vivo* analysiert werden. Das Ziel im ersten Teil dieser Arbeit war der Aufbau eines auf GFP-basierenden Reportersystems zur Charakterisierung unterschiedlicher Regulatorelemente. Zudem sollte im zweiten Teil ein induzierbares System, welches die konditionale Genexpression in Haloarchaea ermöglicht, konstruiert werden. Hierzu wurden die haloarchaealen Regulatorelemente mit den synthetischen Theophyllin-abhängigen Riboswitchen von Gallivan kombiniert und die Funktionalität der Riboswitche in Haloarchaea anschließend analysiert (**Kapitel 4.3**).

4.1. Aufbau eines auf GFP-basierenden, haloarchaealen Reportersystems

Aufgrund der Vorteile von GFP gegenüber enzymatischen Assays sollte ein auf GFP basierendes Reportersystem in Haloarchaea etabliert werden. Als Reportergen wurde das bereits in Haloarchaea erfolgreich angewandte smRS-GFP verwendet (Reuter and Maupin-Furlow, 2004; Schmidt and Pfeifer, 2013). Zum Aufbau des GFP-basierenden Reportersystems wurden im Vorfeld Haloarchaea/*E.coli* shuttle Vektoren hergestellt sowie mehrere *Hfx. volcanii* Stämme auf ihre Eignung als Wirtsorganismus überprüft.

4.1.1. Generierung von haloarchaealen *shuttle* Vektoren

Zum Aufbau des haloarchaealen Reportersystems wurden die beiden Haloarchaea/*E. coli* *shuttle* Vektoren pLacZJB17 und pLacZJB17Δ (Abbildung 8) konstruiert. Die Generierung von pLacZJB17 erfolgte mittels NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs). Die zur Amplifikation der einzelnen Vektorabschnitte verwendeten Matrizen-DNA befinden sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Matrizen zur Amplifikation von pLacZJB17.

Oligonukleotidpaar	Amplifikat	Matrize
pLacJB_1	<i>P_{lac}_lacZ-1</i>	pLacZ-smRSGFP (nicht veröffentlicht)
pLacJB_2	<i>hmgA</i>	pWL102 (Lam and Doolittle, 1989)
pLacJB_3	pHK2	pJAS35 (Pfeifer et al., 1993b)
pLacJB_4	pMB1 + ampR	puc19 (New England Biolabs)
pLacJB_5	<i>lacZ-2</i> + <i>smRS-gfp</i>	pLacZ-smRSGFP (nicht veröffentlicht)

In pLacJB17 befindet sich stromauf des *smRS-gfp*-Leserahmens das *lacZ*-Gen inklusive des *lac*-Promotors. Zur Analyse von Promotoren sowie anderen Regulatorelementen können deren Sequenzen *via* *NcoI* und *BamHI* mit dem *P_{lac}-lacZ*-Fragment ausgetauscht und *smRS-gfp* unter dessen Kontrolle gesetzt werden. Der Austausch von *P_{lac}-lacZ* mit einer regulatorischen Sequenz ermöglicht die Blau-Weiß Selektion in *E. coli*. Zudem wird das *P_{lac}-lacZ-smRS-gfp*-Fragment von einem haloarchaealen L11e rRNA-Terminator (t.L11e) und einer synthetischen Terminatorsequenz (Allers et al., 2010) flankiert, um ein ungewolltes Durchlesen von Transkripten zu verhindern. Der *smRS-gfp*-Leserahmen kann über *BamHI* und *KpnI* ausgetauscht werden. Für eine hohe Kopienzahl in *E. coli* verfügt pLacZJB17 über das pMB1 ori-Derivat von pUC19, während die Replikation des Vektors in Haloarchaea aufgrund des pHK2 Replikons (Kopienzahl: 7 - 8 pro Genomäquivalent (Holmes et al., 1994)) erfolgt. Als Selektionsmarker dienen die Gene *ampR* (Ampicillin-Resistenz in *E. coli*) und das *hmgA*-Gen (Lovastatin-Resistenz in Haloarchaea).

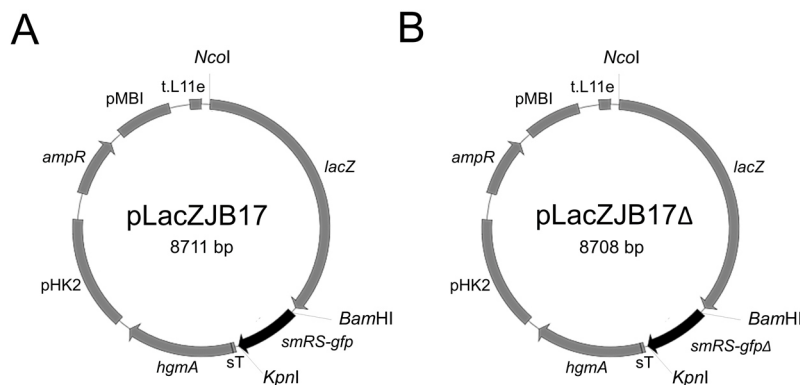


Abbildung 8: Haloarchaea/*E. coli* *shuttle* Plasmide. pLacZJB17 und pLacZJB17Δ enthalten *lacZ* stromaufwärts des *smRS-gfp*-Gens. Das *P_{lac}-lacZ-smRS-gfp*-Fragment wird von einem haloarchaealen Terminator (t.L11e) und einem synthetischen Terminator (sT) flankiert. Für Promotorstudien wird *P_{lac}-lacZ* durch eine Regulatorsequenz mit *NcoI* und *BamHI* ersetzt, während Reportergene *via* *BamHI* und *KpnI* ausgetauscht werden. Die beiden Vektoren unterscheiden sich lediglich in der An- und Abwesenheit des AUG-Startcodons von *smRS-gfp*. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen. *hmgA*: Lovastatin-Resistenz in Haloarchaea, *pHK2*: Replikationsursprung in Haloarchaea, *ampR*: Ampicillin-Resistenz in *E. coli*, *pMB1*: Replikationsursprung in *E. coli*.

Im Vergleich zu pLacJB17 verfügt pLacJB17 Δ über den *smRS-gfp*-Leserahmen ohne AUG-Startcodon. Zur Konstruktion von pLacJB17 Δ wurde das *smRS-gfp* Gen ohne ATG-Start amplifiziert und das resultierende *smRS-gfp* Δ -Fragment via *Bam*HI und *Kpn*I mit *smRS-gfp* in pLacJB17 ausgetauscht.

4.1.2. Untersuchung der Expression in verschiedenen *Hfx. volcanii* Stämmen

Wegen der leichten Kultivierung und guten Zugänglichkeit für genetische Manipulationen ist *Hfx. volcanii* ein geeigneter Kandidat zur Untersuchung der haloarchaealen Expression (Allers et al., 2010; Gregor and Pfeifer, 2001; Tavlaridou et al., 2014). Als potentieller Wirtsorganismus wurden die bereits in vielen Analysen verwendeten Stämme *Hfx. volcanii* WFD11, WR340 und H1424 (Braun et al., 2019; Gregor and Pfeifer, 2001; Winter et al., 2018) gewählt und deren genetische Stabilität mittels smRS-GFP überprüft. Dazu wurde zur Expression von *smRS-gfp* *P_{lac}-lacZ* in pLacJB17 mit dem starken Promoter des *Ferredoxin*-Gens (*P_{fdx}*) aus *Hbt. salinarum* (Pfeifer et al., 1993a) ausgetauscht. Anschließend wurden Zellen des jeweiligen Stammes mit dem resultierenden Vektor pPFDXJB17 transformiert und die Fluoreszenz der Kolonien im Binokular unter Blaulicht sowie von Einzelzellen im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) visualisiert (Abbildung 9).

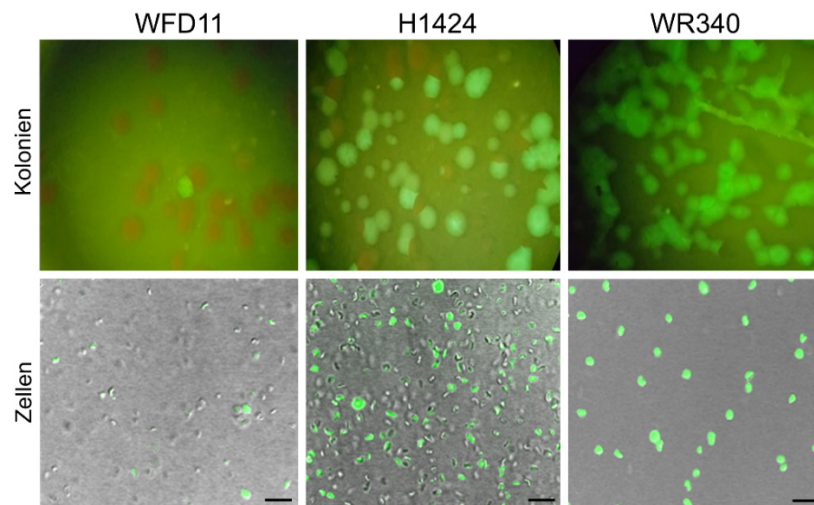


Abbildung 9: Expression von *smRS-gfp* in *Hfx. volcanii* WFD11, H1424 und WR340. Die *Hfx. volcanii* Transformanten enthielten pPFDXJB17 mit *smRS-gfp* unter Kontrolle von *P_{fdx}*. Die Fluoreszenz der Kolonien wurde mittels Fluoreszenz-Binokular (mit blauem Licht) und das smRS-GFP Signal der Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) visualisiert. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10 μ m.

Der geringste Anteil an fluoreszierenden Kolonien und einzelnen Zellen wurde bei *Hfx. volcanii* WFD11 beobachtet. Eine deutlich größere Anzahl an fluoreszierenden Kolonien sowie Einzelzellen zeigte *Hfx. volcanii* H1424. Im Fall von *Hfx. volcanii* WR340 waren alle Kolonien wie auch alle Zellen fluoreszierend.

Somit war *Hfx. volcanii* WR340 in der Expression von *smRS-gfp* stabil und wurde als Wirtsorganismus für weitere Experimente verwendet. Um den Einfluss der Temperatur auf die *smRS-gfp*-Expression zu untersuchen, wurden die *Hfx. volcanii* WR340 Transformanten bei 37 °C, 42 °C oder 45 °C als Flüssigkultur bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen (Inkubation: 36 h) und deren Fluoreszenz in *arbitrary units* (AU) quantifiziert. Die höchste Fluoreszenz mit 367.000 AU konnte bei einer Inkubationstemperatur von 42 °C gemessen werden, während die Anzucht bei 37 °C (188.000 AU) und 45 °C (242.000 AU) zu einer 1,5-fach niedrigeren bzw. 1,9-fach niedrigeren Fluoreszenz führte. Alle weiteren Experimente wurden deshalb bei 42 °C durchgeführt.

4.1.3. Vergleich von smRS-GFP mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen *in vivo*

Der bereits zur Expression von *smRS-gfp* in *Hfx. volcanii* verwendete P_{ftx} Promoter stellt einen der stärksten bekannten haloarchaealen Promotoren dar (Gregor and Pfeifer, 2005). Da das Reportersystem auch zur Analyse von niedrigen Genexpressionen verwendet werden sollte, wurde versucht, die Aktivität des schwachen P_{pD} -Promotors aus der p-vac-Region (Hofacker et al., 2004) mit smRS-GFP zu quantifizieren. Dazu wurde P_{pD} inklusive 5'-UTR_D und den ersten 15 Nukleotiden von p-*gvpD* mit $P_{lac-lacZ}$ in pLacZJB17Δ ausgetauscht und *smRS-gfpΔ* unter Kontrolle des schwachen Promoters gesetzt. Die Fusion mit den ersten 3 Codons von p-*gvpD* erfolgte, um mögliche Translationsprobleme zu vermeiden (Gregor and Pfeifer, 2001). Die resultierenden PD-Transformanten wurden als Flüssigkultur angezogen (OD₆₀₀ von 0,3; Inkubation: 16 h) und deren Fluoreszenz quantifiziert (Abbildung 10).

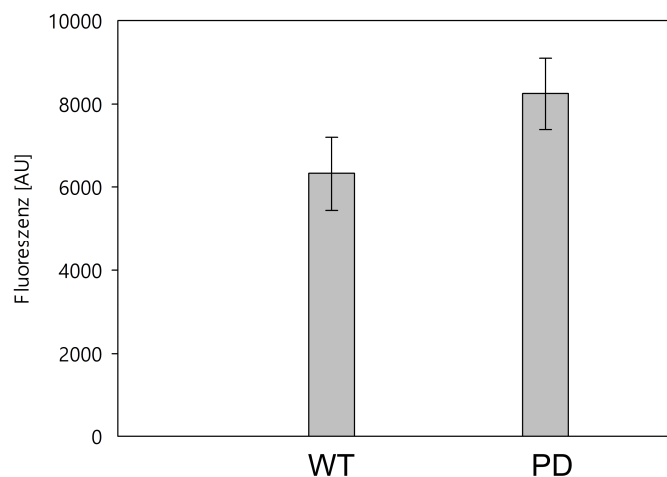


Abbildung 10: Vergleich der Expression von *smRS-gfp* unter Kontrolle von P_{pD} mit der Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii*. Die Transformanten wurden auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,02 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 bei 42 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde in Fluoreszenz-Einheiten (AU) angegeben. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

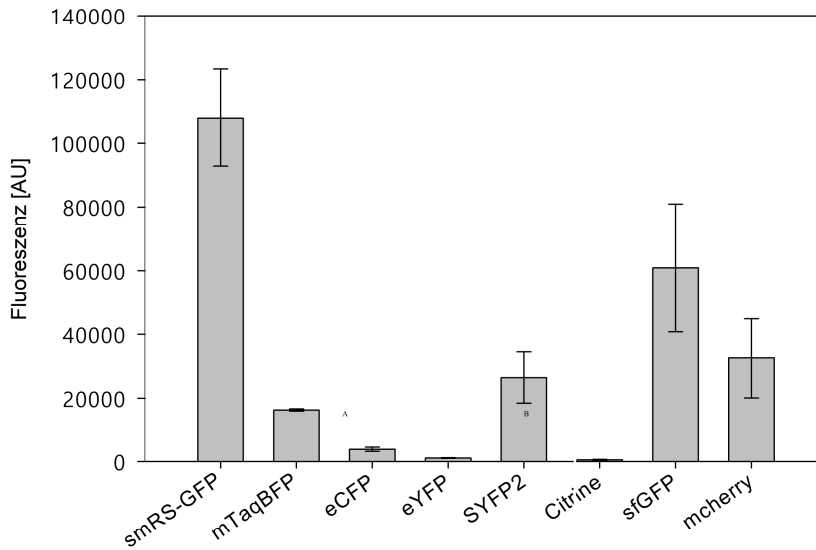
Die Fluoreszenz der PD-Transformanten lag kaum über der Autofluoreszenz des Wildtyps, weswegen eine Quantifizierung schwacher Promotoren mit smRS-GFP als Reporter nicht möglich ist. Um schwache Promotoren zum Aufbau eines haloarchaealen, induzierbaren Expressionssystems charakterisieren zu können, wurde daher die Intensität weiterer Fluoreszenzproteine (**Tabelle 7**) mit der von smRS-GFP in *Hfx. volcanii* verglichen. Da die ausgewählten Fluoreszenzproteine teilweise eine niedrige Fluoreszenzstärke aufweisen, wurden deren Leserahmen mit *smRS-gfp* in pFDXJB17 ausgetauscht und unter Kontrolle des starken P_{fdx} Promoters gesetzt.

Tabelle 7: Getestete Fluoreszenzproteine als Reportergen in *Hfx. volcanii*.

Protein	Excitation [nm]	Emission [nm]	Fluoreszenzstärke	Referenz
mTagBFP2	399	454	32,4	(Subach et al., 2011)
eCFP	433	475	13,0	(Heim et al., 1994; Rizzo et al., 2004)
sfGFP	485	510	54,1	(Pédélecq et al., 2005)
eYFP	513	527	50,9	(Ormo et al., 1996; Kremers et al., 2006)
Citrine	516	529	58,5	(Griesbeck et al., 2001)
SYFP2	515	527	68,7	(Kremers et al., 2006)
mCherry	587	610	15,8	(Shaner et al., 2004; Merzlyak et al., 2007)

Die Fluoreszenzproteine mTagBFP2, SYFP2, sfGFP und mCherry zeigten in *Hfx. volcanii* WR340 (OD₆₀₀ von 0,6) ausreichend hohe Signalstärken, die deutlich über dessen Autofluoreszenz lagen. Im Vergleich zu smRS-GFP (108.000 AU) besaß sfGFP mit 61.000 AU eine um circa die Hälfte schwächere Fluoreszenz. Im Vergleich zu allen anderen Fluoreszenzproteinen zeigte sfGFP aber noch die stärkste Fluoreszenz *in vivo*. Während mCherry (33.000 AU) und SYFP2 (27.000 AU) über eine ähnliche Signalstärke verfügten, wies mTagBFP mit 16.000 AU eine noch gut detektierbare Fluoreszenz auf. Im Fall von eCFP, eYFP und Citrine konnte im Vergleich zur Autofluoreszenz kein signifikant höheres Signal gemessen werden. Im Fluoreszenzmikroskop besaßen Transformanten, die den Leserahmen von mTagBFP, SYFP2, sfGFP oder mCherry exprimierten, ein ausreichend starkes sowie in den kompletten Zellen einheitlich verteiltes Signal. Zellabschnitte mit einer stärkeren bzw. schwächeren Fluoreszenzintensität wurden nicht festgestellt (**Abbildung 11**).

A



B

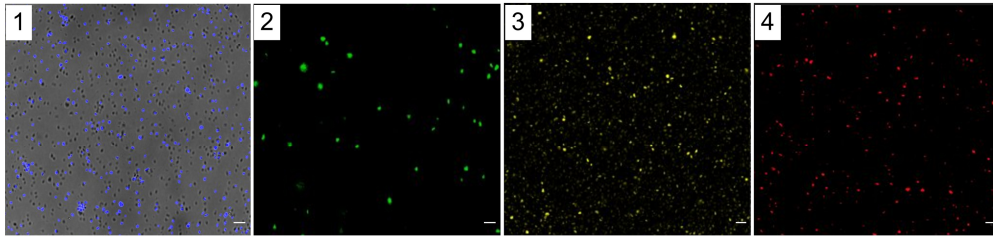


Abbildung 11: Expression verschiedener Fluoreszenzproteine in *Hfx. volcanii*. A: Quantifizierung des Signals verschiedener Fluoreszenzproteine *in vivo*. Die Leserahmen der jeweiligen Fluoreszenzproteine standen unter Kontrolle des starken P_{fdx} -Promotors. Die Transformanten wurden auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,02 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 42 °C inkubiert. Die Fluoreszenz ist in *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* wurde von den Werten abgezogen. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. B: Fluoreszenzmikroskopie von *Hfx. volcanii* WR340 Transformanten. Die Zellen exprimierten die Leserahmen von mTagBFP (1), sfGFP2 (2), SYFP2 (3) und mCherry (4) unter Kontrolle des starken Promotors P_{fdx} . Maßstabsbalken: jeweils 10 μ m.

4.1.4. Mutation von smRS-GFP zur Verbesserung der Fluoreszenz

Da kein getestetes Fluoreszenzprotein eine höhere Intensität als smRS-GFP *in vivo* aufwies, sollte eine smRS-GFP-Variante generiert werden, die als Reportergen für die Analyse schwacher Promotoren in *Hfx. volcanii* verwendet werden kann. Dazu wurden bekannte Substitutionen, die bereits in *E. coli* zu stärker fluoreszierenden GFP-Varianten führten, gewählt (Tabelle 8). Diese Mutationen wurden einzeln oder in Kombination in *smRS-gfp* mittels Mutagenese-PCR eingefügt und die Fluoreszenz der resultierenden smRS-GFP Varianten in *Hfx. volcanii* quantifiziert (Abbildung 12).

Tabelle 8: Eingefügte Mutationen in smRS-GFP und deren Auswirkungen auf die GFP-Eigenschaften in *E. coli*.

Mutation	Eigenschaften	Referenz
S30R	Schnellere Faltungsrate, Proteinstabilisierung	(Pédélecq et al., 2005)
Y39N	Schnellere Faltungsrate, Proteinstabilisierung	(Pédélecq et al., 2005)
F64L	Verbesserte Reifungsrate bei 37°C	(Cormack et al., 1996)
S72A	Verbesserte Faltungsrate, Proteinstabilisierung	(Cubitt et al., 1999)
S147P	Verbesserte Reifungsrate	(Kimata et al., 1997)
N149K	Verbesserte Faltungsrate, Proteinstabilisierung	(Cubitt et al., 1999)
L221K	Reduzierte Hydrophobizität	(Zacharias et al., 2002)
F223R	Reduzierte Hydrophobizität	(Zacharias et al., 2002)
A206K	Reduzierte Hydrophobizität	(Zacharias et al., 2002)

Als Matrize diente pP_DJB17Δ, der komplett amplifiziert wurde. Die Expression der verschiedenen *smRS-gfp* Varianten in *Hfx. volcanii* erfolgte daher ausgehend von dem schwachen Promotor *P_{pd}*. Die hergestellten smRS-GFP Varianten sind in **Tabelle 9** aufgelistet.

Tabelle 9: Generierte smRS-GFP Varianten.

Variante	Substitution
mGFP2	smRS-GFP + F64L
mGFP3	mGFP2 + A206K
mGFP4	mGFP2 + A206K + L221K + F223R
mGFP5	mGFP4 + S30R + Y39N + S147P + N149K
mGFP6	mGFP5 + Q69M + S72A

Da smRS-GFP *in vivo* eine Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur der *Hfx. volcanii* Transformanten aufwies, wurde die F64L-Substitution in smRS-GFPΔ eingefügt, um dessen Temperatursensitivität während der Anzucht von *Hfx. volcanii* zu reduzieren. Im Vergleich zu smRS-GFPΔ zeigte die resultierende Variante (mGFP2) *in vivo* eine 2,5-fach höhere Fluoreszenzintensität bei einer Kultivierung der Zellen bei 42 °C (**Abbildung 12**).

Neben der höheren Kultivierungstemperatur vieler Haloarcheen können auch die hohen Salzbedingungen im Zytoplasma die Löslichkeit und somit die Fluoreszenz von GFP negativ beeinflussen (Deschamps et al., 1995; Ishii et al., 2007). Um die Löslichkeit von mGFP2 weiter zu erhöhen, wurden die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Leucin und Phenylalanin an den Positionen 206, 221 und 223 durch die hydrophilen Aminosäuren Arginin oder Lysin in mGFP2 ersetzt (Jackson et al., 2006; Zacharias et al., 2002). Während mGFP3 die Mutationen A206K und F64L aufwies, verfügte mGFP4 neben A206K und F64L auch über die beiden Substitutionen F221K und F223R. Die Einzelsubstitution A206K und die

Kombination von A206K, F221K sowie F223R führten jedoch nicht zu einer höheren Fluoreszenz von mGFP3 oder mGFP4 im Vergleich zu mGFP2 in *Hfx volcanii* (**Abbildung 12**).

Für Promotorstudien in frühen Wachstumsphasen ist ein schnell faltendes GFP von Vorteil. Daher wurde die mGFP5 Variante erzeugt, die neben F64L und A206K die Substitutionen S30R, Y39N, N149K und S147P enthält (Cubitt et al., 1999; Kimata et al., 1997; Pédélec et al., 2005). Die Quantifizierung der Fluoreszenz *in vivo* zeigte über den Wachstumsverlauf der Transformanten keinen maßgeblichen Unterschied zwischen der mGFP5-Variante und den mGFP-Varianten 2, 3 und 4 (**Abbildung 12**).

Um zu testen, ob die ausgewählten Mutationen zusammen zu einer verbesserten smRS-GFP Version führen, wurde mGFP6 generiert. Zusätzlich zu den zuvor getesteten Substitutionen enthält mGFP6 die S72A-Mutation, und den durch einen PCR-Fehler unbeabsichtigt eingeführten Q69M-Austausch. Im Vergleich zu smRS-GFP wies mGFP6 eine 3,3-fach stärkere Fluoreszenz auf und besaß die höchste Fluoreszenz-Intensität aller smRS-GFP Varianten (**Abbildung 12**).

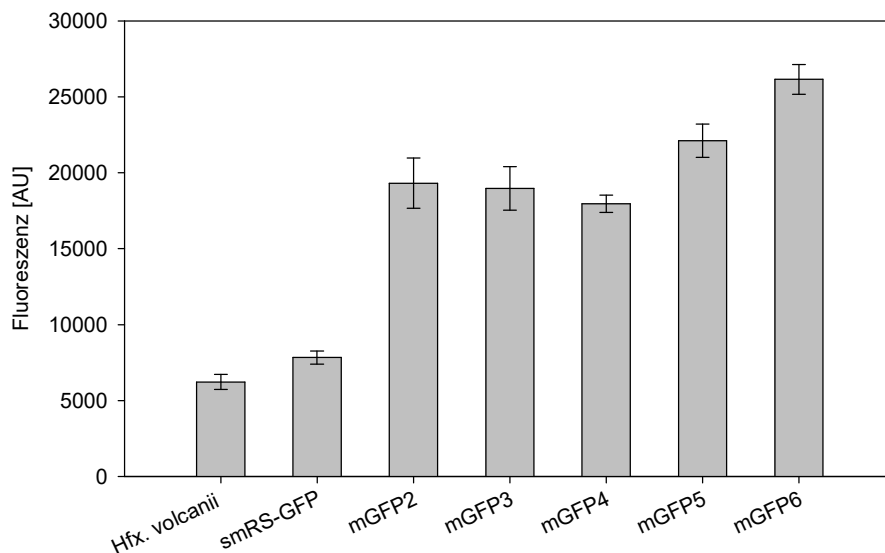


Abbildung 12: Fluoreszenz der smRS-GFP-Varianten *in vivo*. Die untersuchten Transformanten enthielten die entsprechenden Leserahmen unter Kontrolle des schwachen P_{pD} Promoters. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der OD₆₀₀ von 0,6 bei 42 °C angezogen. Die Fluoreszenz wird in willkürlichen Einheiten (AU) angegeben. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Die Intensität des mGFP6-Signals war ausreichend, um die Expression ausgehend vom schwachen P_{pD} -Promotor zu quantifizieren. Daher wurde zur Validierung des mGFP6-Reportersystems in pLacZJB17 das *smRS-gfp*-Gen mit dem *mgfp6*-Leserahmen ausgetauscht und das Plasmid pLacZJB18 generiert. Für Fusionskonstrukte mit *mgfp6* wurde pLacZJB18Δ hergestellt, der den *mgfp6*-Leserahmen ohne ATG-Start (*mgfp6*Δ) enthält.

4.2. Validierung des mGFP6-Reportersystems

Zur Validierung des mGFP6-Reportersystems wurde die Aktivität der beiden starken *housekeeping*-Promotoren P_{fdx} und P_2 sowie der schwächeren vier Gasvesikelpromotoren P_{pA} , P_{pO} , P_{pD} und P_{pF} über das Wachstum der Zellen charakterisiert (**Kapitel 4.1.6**). Zudem wurde der Einfluss der ersten 15 nt der mRNA von $p\text{-gvpA}$, $p\text{-gvpO}$, $p\text{-gvpD}$ und $p\text{-gvpF}$ (**Kapitel 4.1.7**) wie auch der Einfluss der jeweiligen 5'-UTR der $p\text{-gvpA}$ -, $p\text{-gvpD}$ - und $p\text{-gvpF}$ -Transkripte (**Kapitel 4.1.8**) auf deren Translation untersucht.

4.2.1. Charakterisierung von haloarchaealen Promotoren mittels mGFP6 in *Hfx. volcanii*

Im Fokus der Charakterisierung standen die beiden *housekeeping*-Genpromotoren P_{fdx} (*Ferredoxin*-Gen) und P_2 (ribosomale 16S rRNA) sowie die vier Promotoren der *p*-vac-Region (P_{pA} , P_{pO} , P_{pD} , P_{pF}) von *Hbt. salinarum* PHH1. Zur Untersuchung von P_{fdx} und P_2 wurde die jeweilige Promotorsequenz bis zum ATG Start des entsprechenden Gens mit dem *mgfp6*-Leserahmen in *pLacZJB18* fusioniert. Zur Untersuchung der Gasvesikelpromotoren wurde die jeweilige Sequenz bis zu den ersten 15 nt des entsprechenden *p-gvp*-Gens in *pLacZJB18Δ upstream* vor *mgfp6Δ* (*mgfp6*-Leserahmen ohne ATG-Start) inseriert. Im Fall von P_{pA} , P_{pD} und P_{pF} enthielten die Fusionskonstrukte neben der Promotersequenz auch die jeweilige 5'-UTR von $p\text{-gvpACNO}$, $p\text{-gvpDE}$ bzw. $p\text{-gvpFGHIJKLM}$. Die resultierenden *Hfx. volcanii* Transformanten wurden nach dem entsprechenden Konstrukt bezeichnet. Die Bezeichnung der Transformante entspricht somit dem zu charakterisierenden Promotor (**Abbildung 13**). Die Fluoreszenz der Transformanten wurde nach 16, 24, 36 oder 48 h Wachstum (OD_{600} von 0,3; 0,6; 1,2 und 3,0) quantifiziert (**Abbildung 14, Tabelle 10**). Die Inkubation erfolgte bei 42 °C.

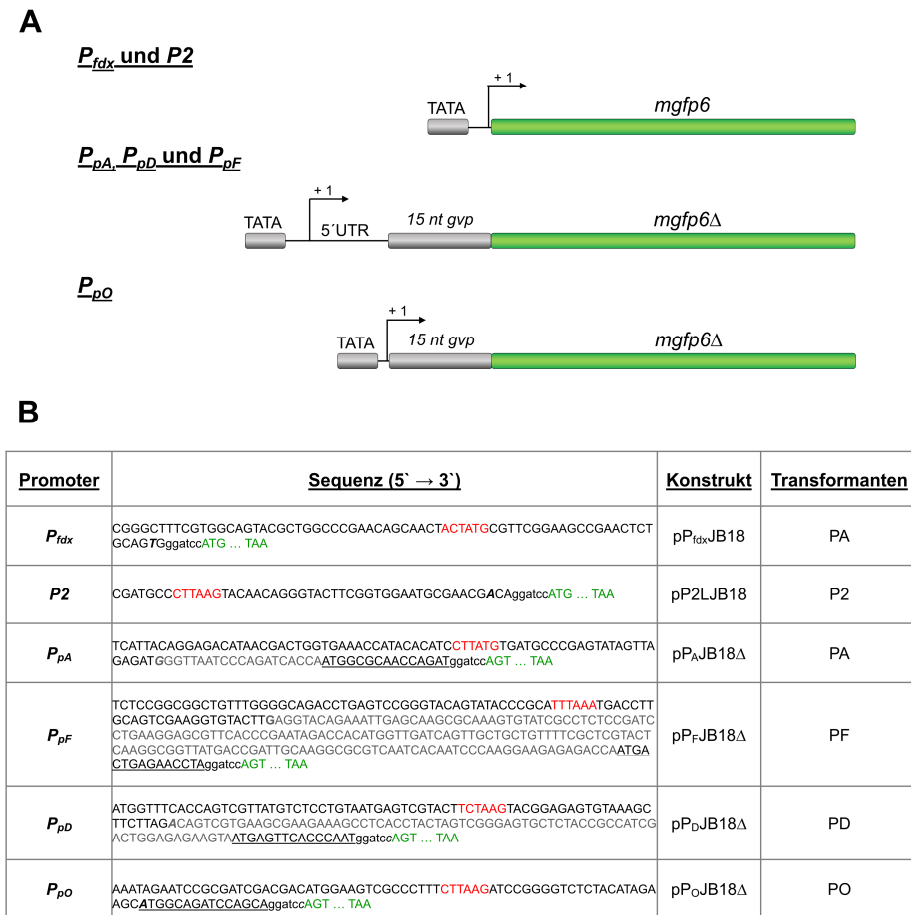


Abbildung 13: Fusionskonstrukte zur Quantifizierung der *mgfp6*-Expression ausgehend von unterschiedlichen Promotoren. **A:** Schematische Darstellung der Promotor-*mgfp6* Fragmente. Zur Quantifizierung der verschiedenen Promotoren wurde *upstream* von *mgfp6* die entsprechende Promotorsequenz inklusive des Bereichs bis zum ATG-Start des jeweils stromabwärts gelegenen Gens gesetzt. Im Fall der Gasvesikelpromotoren wurden die ersten 15 Nukleotide des jeweiligen p-*gvp*-Gens mit *mgfp6*Δ (ohne ATG-Start) fusioniert. Die Konstrukte zur Quantifizierung von P_{pA} , P_{pD} und P_{pF} enthielten zusätzlich die 5'-UTR von p-*gvpA*, p-*gvpD* oder p-*gvpF*. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. **B:** DNA-Sequenzen des Fusionsbereichs. Die TATA-Box der Promotoren ist in Rot und der Transkriptionsstart in fett und kursiv dargestellt. Die ersten 15 nt der p-*gvp*-Gene sind unterstrichen, während die spezifische 5'-UTR grau hinterlegt ist. Die *Bam*HI-Schnittstelle ist in kleinen Buchstaben geschrieben. Die ersten drei Nukleotide des offenen Leserahmens von *mgfp6* bzw. *mgfp6*Δ sowie deren Stopcodon sind in Grün hervorgehoben.

Die höchste Fluoreszenz wurde mit 318.000 AU bei Transformanten gemessen, die *mgfp6* unter Kontrolle des P_{fdx} -Promotors in der frühen exponentiellen Wachstumsphase exprimierten. Im weiteren Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase blieb die Fluoreszenz nahezu identisch, bevor sich die Aktivität des P_{fdx} -Promotors während der stationären Phase um die Hälfte verringerte. Der P_2 Promoter zeigte bis zum Erreichen der späten stationären Phase eine konstitutive und gleichbleibend hohe Aktivität, allerdings mit 210.000 AU auf einem im Vergleich zu P_{fdx} niedrigeren Niveau. In der spät-stationären Phase nahm die Aktivität bis auf 162.000 AU ab und war somit auf einer ähnlichen Stufe wie bei P_{fdx} (Abbildung 14, Tabelle 10).

Die Gasvesikelpromotoren führten zu deutlich geringeren *mgfp6Δ*-Expressionen, die auch einen über das Wachstum sich ändernden Verlauf aufwiesen. So war die Expression ausgehend von P_{pA} in der frühen exponentiellen Wachstumsphase mit 69.000 AU am höchsten, während eine reduzierte Fluoreszenz im spät-exponentiellen (41.000 AU) und frühen stationären Wachstum (36.000 AU) beobachtet wurde. In der spät-stationären Phase führte der P_{pA} Promoter zu einer fast so hohen Expression wie in der frühen exponentiellen Wachstumsphase. PO-Transformanten mit *mgfp6Δ* unter Kontrolle von P_{pO} wiesen die höchste Fluoreszenz mit 99.000 AU im frühen exponentiellen Wachstum auf, die sich während des weiteren Verlaufes der exponentiellen Wachstumsphase verringerte (30.000 AU), beim Übergang in die stationäre Phase wieder anstieg und im späten Wachstum erneut auf 30.000 AU abfiel. Im Vergleich zu PA- und PO-Transformanten zeigten PD- und PF-Transformanten geringere mGFP6Δ-Signale. Die höchste Fluoreszenz bei PD- und PF-Transformanten wurde jeweils in der frühen exponentiellen Wachstumsphase mit 18.000 AU bzw. 28.000 AU gemessen. Die Expression ausgehend der beiden Promotoren nahm ab der exponentiellen Wachstumsphase bis zur spät-stationären Phase kontinuierlich ab (Abbildung 14, Tabelle 10).

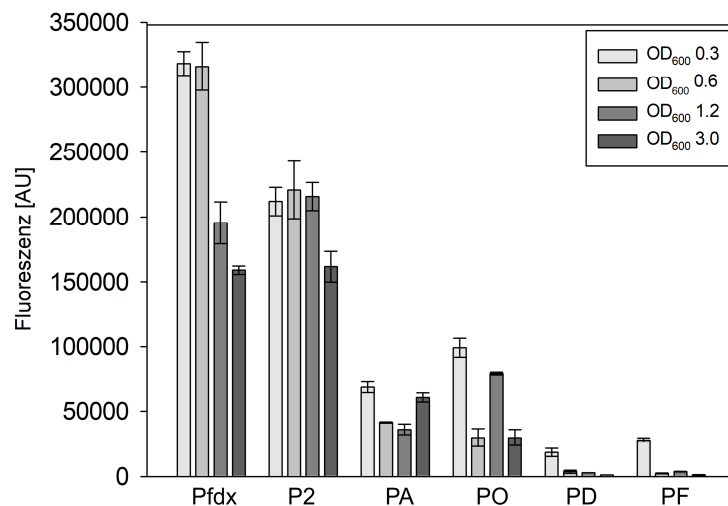


Abbildung 14: Expression ausgehend von unterschiedlichen Promotoren. Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 16, 24, 36 und 48 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 0,3; 0,6; 1,2 und 3,0) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 10: Promotorenaktivitäten während des gesamten Wachstums.

Transformanten	Basale Aktivität / Fluoreszenz [AU] x 10 ^{3*}				
	OD ₆₀₀	0.3	0.6	1.2	3.0
Pfdx		318 ± 9	316 ± 18	196 ± 16	159 ± 3
P2		212 ± 11	221 ± 22	216 ± 11	162 ± 12
PA		69 ± 4	41 ± 0,4	36 ± 4	61 ± 4
PO		99 ± 7	30 ± 7	79 ± 1	30 ± 6
PD		18 ± 3	4 ± 1	3 ± 0,1	1 ± 0,005
PF		28 ± 2	2 ± 0,2	4 ± 0,2	1 ± 0,2

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

Insgesamt wurde eine konstitutive Genexpression bei P_{fdb} bis zum Eintritt der Zellen in die stationäre Phase und bei P_2 bis in die spät-stationäre Phase hinein detektiert. Dagegen führten die vier Gasvesikelpromotoren zu einem über das Wachstum sich änderndes Expressionsmuster von *mgfp6*. Die Charakterisierung der Genexpression ausgehend von den vier Gasvesikelpromotoren erfolgte in Anwesenheit der ersten 15 nt des jeweiligen Leserahmens sowie im Fall von *p-gvpA*, *p-gvpD* und *p-gvpF* in Gegenwart des jeweiligen *leader*-Bereichs (5'-UTR_A, 5'-UTR_D und 5'-UTR_F). Um zu überprüfen, ob die ersten 15 nt eines Leserahmens sowie die 5'-UTR der jeweiligen Gene für die wachstumsabhängige Genexpression verantwortlich ist, wurde deren Auswirkung auf die Expression über die Zeit untersucht.

4.2.2. Einfluss von haloarchaealen Regulatoren auf die Genexpression

Die archaeale Translation kann u. a. vom Kontext des AUG-Startcodons oder der 5'-UTR des jeweiligen Gens beeinflusst werden (Brenneis and Soppa, 2009; Chen et al., 2015; Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Häufig bilden sich im Bereich um das AUG-Startcodon und/oder innerhalb von 5'-UTRs Sekundärstrukturen aus, die die Translationsinitiierung stören (Brenneis and Soppa, 2009; Chen et al., 2015). Im Fall der Gene *hvo_2837* (*hoxA like transcriptional regulator*) und *hvo_0721* (*conserved hypothetical protein*) von *Hfx. volcanii* spielen sowohl die 5'- als auch die 3'-UTR eine Rolle innerhalb der wachstumsphasen-abhängigen Translationsregulation (Brenneis and Soppa, 2009).

Um Translationsprobleme bei der heterologen Genexpression zu vermeiden, wurden in früheren Studien zur Bestimmung einer *gvp*-Promotoraktivität (Gregor and Pfeifer, 2001) die ersten 15 nt dieser Gene an den offenen Leserahmen des Reportergens *bgaH* fusioniert. Analog dazu wurden auch in dieser Arbeit diese 15 Startnukleotide des jeweiligen *p-gvp*-Gens mit dem *mgfp6Δ*-Reportergen fusioniert. Daher enthalten die zur Charakterisierung von P_{pA} , P_{pD} und P_{pF} generierten Fusionskonstrukte neben dem entsprechenden Promotor, die ersten 15 nt des jeweiligen *p-gvp*-Gens sowie dessen mRNA-*leader*-Bereich. Aufgrund der *leaderlosen* Translation von *p-gvpO* enthielt das Konstrukt zur Quantifizierung der Aktivität von P_{pO} nur die ersten 5 Triplets von *p-gvpO* fusioniert an *mgfp6Δ*. Um mögliche Sekundärstrukturen im Bereich des AUG-Startcodons der jeweiligen Gene sowie innerhalb von 5'-UTR_A, 5'-UTR_D und 5'-UTR_F zu lokalisieren, wurden *in silico*-Analysen durchgeführt. Zur Vorhersage von Sekundärstrukturen in 5'-UTR_D sowie der ersten 15 nt von *p-gvpD* wurde „RNA Folding Form (version 2.3 energies)“ des mfold Web Servers (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3>, 25.07.2019; 19:01) verwendet. Die Analyse erfolgt durch die Berechnung der möglichen RNA-Faltung bei einer bestimmten Temperatur in Bezug auf die minimale freie Faltungsenergie nach dem Algorithmus von Walter et al. (1994). Als Temperatur wurden 42 °C gewählt, was der Anzuchttemperatur der *Hfx. volcanii* Transformanten entsprach.

In allen Fällen wurde mindestens eine putative Sekundärstruktur vorhergesagt, die sich unter Einbeziehung des AUG-Startcodons mit den flankierenden Nukleotiden bildet (**Abbildung 15**).

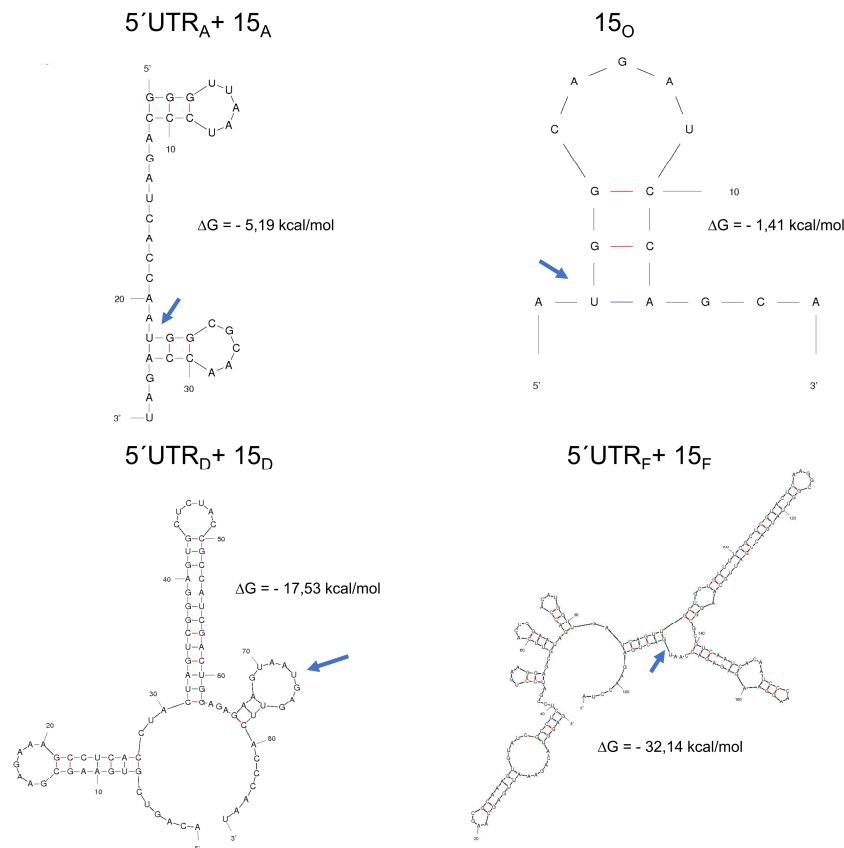


Abbildung 15: Analyse putativer Sekundärstrukturen direkt stromaufwärts von *p-gvpA*, *p-gvpO*, *p-gvpD* und *p-gvpF*. Die Strukturanalyse erfolgte mittels des „RNA Folding Form (version 2.3 energies)“ des mfold Web Servers. Als Temperatur zur Analyse wurden 42 °C gewählt. Bei mehreren Strukturvorhersagen wurde diejenige mit dem niedrigsten ΔG -Wert gewählt. Die Pfeile zeigen die Position des jeweiligen AUG-Startcodons. Rote Striche stellen GC-Basenpaarungen, grüne Striche UG-Basenpaarungen und blaue Striche UA-Basenpaarungen dar. 15_A: erste 15 nt von *p-gvpA*, 15_O: erste 15 nt von *p-gvpO*, 15_D: erste 15 nt von *p-gvpD*, 15_F: erste 15 nt von *p-gvpF*.

Zur Bestimmung eines möglichen Einflusses der ersten 15 nt der jeweiligen Gene wie auch deren 5'-UTR wurden diese Sequenzen jeweils deletiert und die Auswirkung auf die *mgfp6*-Expression analysiert.

4.2.3. Einfluss der ersten 15 nt auf die Translation der *p-gvp*-Gene

Um zu überprüfen, ob die Translation der *mgfp6*-mRNA durch die ersten 15 nt der *p-gvp*-Gene beeinflusst wird, wurde die jeweilige stromaufwärts gelegene Promotorsequenz bis zum ATG-Start des entsprechenden Gens jeweils ohne die ersten 15 nt des entsprechenden Leserahmens in pLacJB18 mit *mgfp6* fusioniert (**Abbildung 16**) und die Fluoreszenz der resultierenden Transformanten über das Wachstum quantifiziert (**Abbildung 17, Tabelle 11**). Als Kontrolle wurde die Stärke des mGFP6-Signals der PA-, PO-, PD- bzw. PF-Transformanten (**Abbildung 13, Abbildung 14**), die die jeweiligen ersten 15 nt des jeweiligen *p-gvp*-Gens enthielten, bestimmt. Die Untersuchung der Expression von *p-gvpA*, *p-gvpD* und *p-gvpF* erfolgte in diesem Experiment in Gegenwart des entsprechenden *leader*-Bereichs.

A

P_{pA} , P_{pD} und P_{pF}



P_{pO}



B

Promoter	Sequenz (5' → 3')	Konstrukt	Transformanten
P_{pA}	TCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAAACCATACACATCCTTATGTGATGCCCGAGTATAG TTAGAGATGGGTTAATCCCAGATCACCAggatccATG ... TAA	pP _A Δ15JB18	PA-Δ15
P_{pF}	TCTCCGGCGGCTGTTTGGGGCAGACCTGAGTCCGGGTACAGTATACCCGCATTAAATGAC CTTGCACTCGAAGGTGACTTTGAGGTACAGAAATTGAGCAAGCGCAAAGTGATCGCCTCT CCGATCCTGAAGGAGCGTTTACCCGAATAGACCACATGGTTGATCAGTTGCTGCTGTTTTTCG CTCGTACTCAAGGCGGTTATGACCGATTGCAAGGCGCGTCAATCACAATCCCAAGGAAGAG AGACCAggatccATG ... TAA	pP _F Δ15JB18	PF-Δ15
P_{pD}	ATGGTTTCACCACTCGTTATGTCTCTGTAATGAGTCGTACTCTTAAGTACGGAGAGTGTA GCTTCTTAGACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCTCACCTACTAGTCGGGAGTGCTCTACCGC CATCGACTGGAGAGAAAGTAggatccATG ... TAA	pP _D Δ15JB18	PD-Δ15
P_{pO}	AAATAGAATCCGCGATCGACGACATGGAAGTCGCCCTTTCTTAAGATCCGGGGTCTCTACAT AGAAGCggatccATG ... TAA	pP _O Δ15JB18	PO-Δ15

Abbildung 16: Fusionen zur Quantifizierung der Translationseffizienz ohne die ersten 15 nt des p-gvp Leserahmens. A: Schematische Darstellung der Promotor-*mgfp6* Fragmente. Zur Quantifizierung der Translationseffizienz wurde genau von *mgfp6* die entsprechende Promotorsequenz inklusive des Bereichs bis zum ATG-Start des jeweils stromab gelegenen Gens gesetzt. Konstrukte zur Quantifizierung der Translation von p-gvpA, p-gvpD und p-gvpF enthielten deren 5'-UTR. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. TATA: TATA-Box. B: DNA-Sequenzen des Fusionsbereiches. Die TATA-Box der Promotoren ist in Rot und der Transkriptionsstart in fett und kursiv dargestellt. Die spezifische 5'-UTR ist grau hinterlegt. Die *Bam*HI-Schnittstelle ist in kleinen Buchstaben geschrieben. Die ersten drei Nukleotide des offenen Leserahmens von *mgfp6* sowie dessen Stopcodon ist jeweils in Grün hervorgehoben.

Die Fluoreszenzmessungen der PA-Δ15- und PA-Transformanten wiesen über den gesamten Wachstumsverlauf keine signifikanten Unterschiede auf. Im Fall von PO-Δ15-, PD-Δ15- und PF-Δ15-Transformanten führte dagegen die Abwesenheit der ersten 15 nt zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz ab der mittleren exponentiellen Wachstumsphase. Während die ersten 15 nt von p-gvpD mit einer 7,8-fach stärkeren Fluoreszenz den größten Einfluss auf die Expression zeigten, führte die Abwesenheit der ersten 5 Codons von p-gvpO zu einer bis zu 2,9-fach höheren und das Fehlen der ersten Basentriplets von p-gvpF zu einer bis zu 5-fach stärkeren Fluoreszenz *in vivo*. Eine konstitutive Genexpression wurde in keinem Fall beobachtet (Abbildung 17, Tabelle 11).

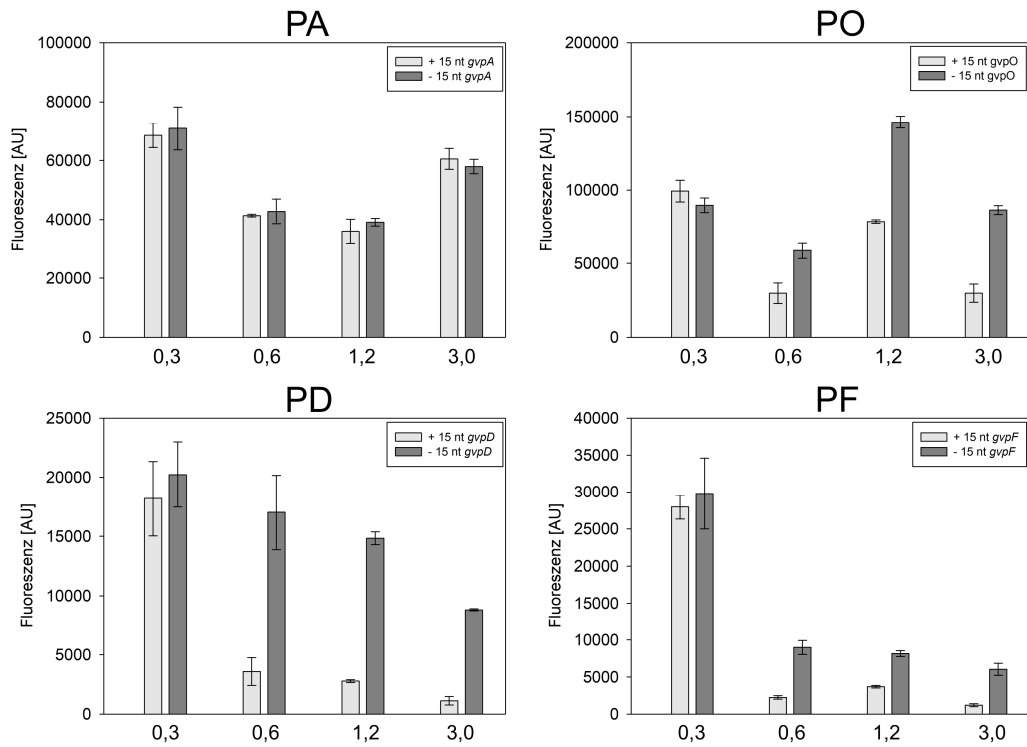


Abbildung 17: Vergleich *mgfp6* Expression mit und ohne 15 nt der jeweiligen *p-gvp*-Gene. Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 16, 24, 36 und 48 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 0,3; 0,6; 1,2 und 3,0) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. PA: Transformanten mit *mgfp6* unter Kontrolle von *P_{pA}*. PO: Transformanten mit *mgfp6* unter Kontrolle von *P_{pO}*. PD: Transformanten mit *mgfp6* unter Kontrolle von *P_{pD}*. PF: Transformanten mit *mgfp6* unter Kontrolle von *P_{pF}*.

Tabelle 11: Einfluss der ersten 15 nt auf die Expression der *p-gvp*-Gene.

Transformanten	Basale Aktivität / Fluoreszenz [AU] x 10 ^{3*}				
	OD ₆₀₀	0.3	0.6	1.2	3.0
PA		69 ± 4	41 ± 0,4	36 ± 4	61 ± 4
PA-Δ15		71 ± 7	43 ± 4	39 ± 1	58 ± 2
Faktor		1,0	1,0	1,0	/
PO		99 ± 7	30 ± 7	79 ± 1	30 ± 6
PO-Δ15		90 ± 5	59 ± 5	146 ± 4	86 ± 3
Faktor		/	2,0	1,8	2,9
PD		18 ± 3	4 ± 1	3 ± 0,1	1 ± 0,4
PD-Δ15		20 ± 3	17 ± 3	15 ± 0,5	9 ± 0,08
Faktor		1,1	4,3	5,0	9,0
PF		28 ± 2	2 ± 0,2	4 ± 0,2	1 ± 0,02
PF-Δ15		30 ± 5	9 ± 1	8 ± 0,4	6 ± 0,08
Faktor		1,1	4,5	2,0	6,0

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

Die ersten 15 nt von *p-gvpD*, *p-gvpF* und *p-gvpO* besitzen offenbar jeweils eine regulatorische Funktion auf die Genexpression. Zudem wurden die Auswirkungen der ersten 15 nt des *Ferredoxin*-Gens bzw. der 16S rRNA auf dessen Expression bzw. dessen Synthese untersucht. Dazu wurde der Bereich ab der Promotorsequenz von *P_{fdx}* bzw. *P2* bis zu den ersten 15 nt des *Ferredoxin*-Gens bzw. der 16S rRNA in pLacJB18Δ mit *mgfp6Δ* fusioniert (**Abbildung 18**) und die Fluoreszenz *in vivo* gemessen (**Abbildung 19**, **Tabelle 12**). Als Vergleich dienten Varianten der Konstrukte ohne die ersten 15 nt des jeweiligen Gens (**Abbildung 13**, **Abbildung 14**).

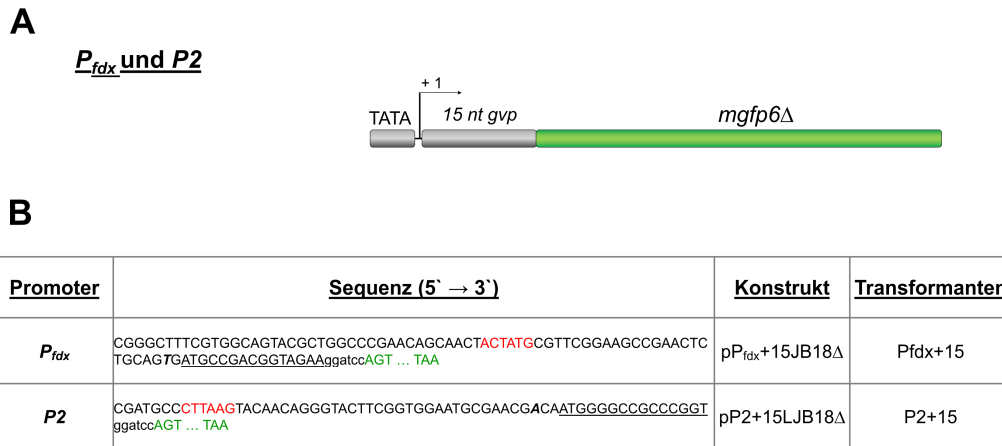


Abbildung 18: Fusionskonstrukte zur Quantifizierung der Fluoreszenz des Reporters bei Anwesenheit der ersten 15 nt des *fdx*-Gens und der 16S rRNA. **A:** Schematische Darstellung der Promotor-*mgfp6* Fragmente. Zur Quantifizierung der Expression wurde genaufwärts von *mgfp6Δ* die entsprechende Promotorsequenz inklusive des Bereichs bis zum ATG-Start und den ersten 15 nt des jeweiligen Leserahmens gesetzt. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. **B:** DNA-Sequenzen des Fusionsbereiches. Die TATA-Box der Promotoren ist in Rot und der Transkriptionsstart in fett und kursiv dargestellt. Die spezifische 5'-UTR ist grau hinterlegt. Die *Bam*HI-Schnittstelle ist in Kleinbuchstaben angegeben. Die ersten 15 Nukleotide des offenen Leserahmens von *fdx* bzw. die ersten 15 nt der 16S rRNA sind unterstrichen. Der Beginn des offenen Leserahmens und das Stopcodon von *mgfp6Δ* ist jeweils in Grün hervorgehoben.

Bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase wurde kein signifikanter Unterschied der Fluoreszenz von Pfdx- und Pfdx+15-Transformanten beobachtet. Ab der mittleren exponentiellen Wachstumsphase führte die Anwesenheit der ersten 5 Basentriplets von *fdx* zu einer circa um die Hälfte schwächeren und in der stationären Phase zu einer 9-fach niedrigeren Fluoreszenz. Dagegen wurde in Gegenwart der ersten 15 nt der 16S rRNA, bereits in der frühen exponentiellen Wachstumsphase ein deutlicher Rückgang des mGFP6Δ-Signals *in vivo* beobachtet. So besaßen P2-Transformanten im Vergleich zu P2+15-Transformanten ein 13-fach schwächeres mGFP6Δ-Signal in der frühen exponentiellen Wachstumsphase und im weiteren Wachstumsverlauf eine bis zu 44-fach niedrigere Fluoreszenz (**Abbildung 19**, **Tabelle 12**).

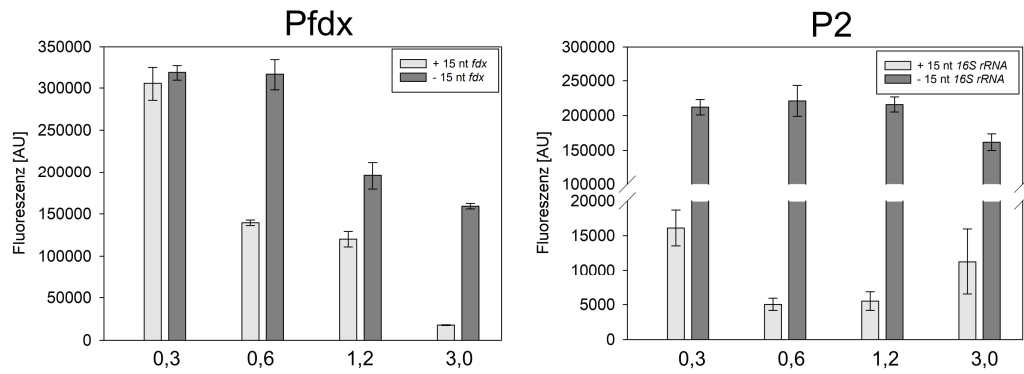


Abbildung 19: Vergleich der *mgfp6*-Expression mit und ohne den ersten 15 nt des *fdx*-Gens bzw. der 16S rRNA. Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 16, 24, 36 und 48 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 0,3; 0,6; 1,2 und 3,0) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Insgesamt zeigten die ersten 15 nt der *housekeeping*- sowie *p-gvp*-Gene, mit Ausnahme von *p-gvpA*, einen negativen Einfluss auf die Expression des jeweiligen Gens. Der größte Effekt wurde mit einem Rückgang der Fluoreszenz um den Faktor 44 bei den ersten 15 nt der 16S rRNA detektiert. Bei der Expression von *fdx* führte die Anwesenheit der ersten 5 Codons zum Verlust des konstitutiven Charakters. Im Fall der *p-gvp*-Gene scheint dagegen kein Zusammenhang zwischen der wachstumsabhängigen Expression und der An- oder Abwesenheit der ersten Basentriplets zu bestehen, da beim Fehlen der ersten Triplets keine Translationsprobleme beobachtet wurden. Daher wurde die Fusion von mGFP6Δ mit den ersten 15 nt des jeweiligen Gens hier beibehalten.

Tabelle 12: Einfluss der ersten 15 nt des *fdx*-Gens und der 15 nt der 16S rRNA auf deren Synthese.

Transformanten	Basale Aktivität / Fluoreszenz [AU] x 10 ^{3*}				
	OD ₆₀₀	0,3	0,6	1,2	3,0
P _{fdx} +15		305 ± 20	139 ± 3	120 ± 9	18 ± 0,3
P _{fdx} -Δ15		318 ± 9	316 ± 18	196 ± 16	159 ± 3
Faktor		1,0	2,3	1,6	8,8
P2+Δ15		16 ± 3	5 ± 0,9	5 ± 1	11 ± 5
P2		212 ± 11	221 ± 22	216 ± 11	162 ± 12
Faktor		13,3	44,2	43,3	14,7

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

4.2.4. Effekt der 5'-UTR auf die Translation von p-gvpA, p-gvpD und p-gvpF

In früheren Studien wurde ein negativer Einfluss der 5'-UTR der p-gvpH-mRNA (5'-UTR_H) auf die Translation des p-gvpH-Leserahmens nachgewiesen. Hier führte die Deletion von 5'-UTR_H zu einer 15-fachen Steigerung der Translationseffizienz (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Untersuchungen auf einen wachstumsabhängigen Effekt von 5'-UTR_H auf die Translation wurden bislang nicht durchgeführt.

Um einen möglichen wachstumsabhängigen Effekt ausgehend der 5'-UTR von p-gvpA (5'-UTR_A, 20 nt), p-gvpD (5'-UTR_D, 72 nt) und p-gvpF (5'-UTR_F, 169 nt) zu untersuchen, wurde die entsprechende Sequenz mit der jeweiligen Promotorregion ohne den Bereich zwischen +3 und dem ATG-Start des jeweiligen p-gvp-Gens mit *P_{lac}-lacZ* in pLacZJB18Δ ausgetauscht (Abbildung 20).

A

Konstrukte mit 5'UTR



Konstrukte ohne 5'UTR



B

Promoter	Sequenz (5' → 3')	Konstrukt	Transformanten
<i>P_{pA}</i>	TCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAACCATACACATCCTTATGTGATGCCCGAGTATAG TTAGAGATGGGTTAATCCAGATCACCAATGGCGCAACCAGATggatccAGT ... TAA	pP _A JB18Δ	PA
<i>P_{pA}Δ5'UTR_A</i>	TCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAACCATACACATCCTTATGTGATGCCCGAGTATAG TTAGAGATGGATGGCGCAACCAGATggatccAGT ... TAA	pP _A oLJB18Δ	PA-oL
<i>P_{pD}</i>	ATGGTTTCACCAAGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAGTCGTACTCTCTAAGTACGGAGAGTGTA GCTTCTTAGACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCCTACCTACTAGTCGGGAGTGCTCTACCGC CATCGACTGGAGAGAAGTAATGAGTTACCCCAATggatccAGT ... TAA	pP _D JB18Δ	PD
<i>P_{pD}Δ5'UTR_D</i>	ATGGTTTCACCAAGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAGTCGTACTCTCTAAGTACGGAGAGTGTA GCTTCTTAGACATGAGTTACCCCAATggatccAGT ... TAA	pP _D oLJB18Δ	PD-oL
<i>P_{pF}</i>	TCCTCGGCGGCTGTTTGGGGCAGACCTGAGTCCGGGTACAGTATACCCGCATTAATGACCT TTGAGTCGAAGGTGTACTTGAATGACTGAGAACCTAagatccAGT ... TAA	pP _F JB18Δ	PF
<i>P_{pF}Δ5'UTR_F</i>	TCCTCGGCGGCTGTTTGGGGCAGACCTGAGTCCGGGTACAGTATACCCGCATTAATGACCT TTGAGTCGAAGGTGTACTTGAATGACTGAGAACCTAagatccAGT ... TAA	pP _F oLJB18Δ	PF-oL

Abbildung 20: Konstrukte zur Untersuchung des Einflusses der 5'-UTR von p-gvpA, p-gvpD und p-gvpF auf deren Translation. A: Schematische Darstellung der Promotor-mgfp6 Fragmente. Zur Untersuchung des Einflusses der 5'-UTR der jeweiligen p-gvp-Transkripte auf deren Expression wurden stromaufwärts von mgfp6Δ (ohne ATG-Start) die entsprechende Promotorsequenz inklusive des Bereichs bis zum ATG-Start des jeweiligen Leserahmens mit und ohne den spezifischen leader Bereich gesetzt. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. B: DNA-Sequenzen des Fusionsbereiches. Die Bezeichnung oL steht für „ohne leader“. Die TATA-Box der Promotoren ist rot und der Transkriptionsstart in fett und kursiv dargestellt. Die ersten 15 nt der p-gvp-Gene sind unterstrichen, während die ersten beiden Nukleotide der spezifischen 5'-UTR grau hinterlegt sind. Die BamHI-Schnittstelle ist in kleinen Buchstaben geschrieben. Die ersten drei Nukleotide des offenen Leserahmens von mgfp6Δ sowie dessen Stopcodon sind in Grün hervorgehoben.

Die Deletion ab Position +3 erfolgte, damit der Transkriptionsstart erhalten blieb und die Transkription der *leaderlosen* 15-*gvp-mgfp6Δ* Fusionsfragmente sichergestellt war. Die resultierenden Plasmide pP_{AO}LJB18Δ, pP_{DO}LJB18Δ bzw. pP_{FO}LJB18Δ unterschieden sich von pP_AJB18, pP_DJB18 bzw. pP_FJB18 nur im Fehlen der jeweiligen 5'-UTR (**Abbildung 20**). Die Translation der 15-*gvp-mgfp6Δ* Transkripte mit und ohne 5'-UTR wurde über die Fluoreszenz der Transformanten zu unterschiedlichen Wachstumsphasen (OD₆₀₀ von 0,3; 0,6; 1,2 und 3,0) quantifiziert und miteinander verglichen (**Abbildung 21, Tabelle 13**). Die Abkürzung oL steht dabei für „ohne *leader*“.

Die höchste Fluoreszenz wurde mit 101.000 AU bei PA-oL-Transformanten konstant über die komplette exponentielle Wachstumsphase detektiert. Im Vergleich zu den PA-Transformanten (mit pP_AJB18Δ) wurde bis zum Eintritt in die stationäre Phase eine 1,4- bzw. 2,4-fach höhere Fluoreszenz gemessen. Im Gegensatz zu PA- wurde bei PA-oL-Transformanten eine gleichbleibende Fluoreszenz innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet und ein Absinken des mGFP6Δ-Signals erst beim Übergang in die stationäre Phase detektiert. Ab der frühen stationären Phase (OD₆₀₀ von 1,2) waren keine Abweichungen in der Fluoreszenzintensität zwischen PA- und PA-oL-Transformanten mehr festzustellen (**Abbildung 21, Tabelle 13**).

Bei Abwesenheit von 5'-UTR_D wurde ebenfalls eine Erhöhung des mGFP6Δ-Signals festgestellt. So zeigten PDoL-Transformanten über das ganze Wachstum eine höhere Fluoreszenz als PD-Transformanten. Ein Rückgang der Fluoreszenzintensität wurde bei PD- sowie bei PDoL-Transformanten mit fortschreitendem Alter der Kultur beobachtet. Der Vergleich der Fluoreszenzwerte in den einzelnen Wachstumsphasen ergab eine stetig größer werdende Differenz des mGFP6-Signals zwischen PD- und PD-oL-Transformanten. So wurde in der exponentiellen Wachstumsphase eine 3,8-fach höhere bzw. 7-fach höhere Fluoreszenz und beim Übergang in die stationäre Phase sowie in der späten stationären Phase ein 11-fach bzw. 14-fach stärkeres mGFP6Δ-Signal der PD-oL-Transformanten detektiert (**Abbildung 21, Tabelle 13**).

Im Fall von PF- und PF-oL-Transformanten wurde ein deutlich geringerer Unterschied zwischen der An- und Abwesenheit von 5'-UTR_F beobachtet. So besaßen PF-oL-Transformanten ohne 5'-UTR_F in der exponentiellen Wachstumsphase ein 1,8-fach bzw. 2,6-fach stärkeres und beim Übergang in die stationäre Phase ein 2,8-fach stärkeres mGFP6Δ-Signal als PF-Transformanten. In der späten stationären Phase wurde dagegen keine erhöhte Fluoreszenz der PF-oL-Transformanten gemessen. Eine konstante Expression von *mgfp6Δ* über den Wachstumsverlauf wurde durch die Deletion von 5'-UTR_D und 5'-UTR_F nicht erzielt (**Abbildung 21, Tabelle 13**).

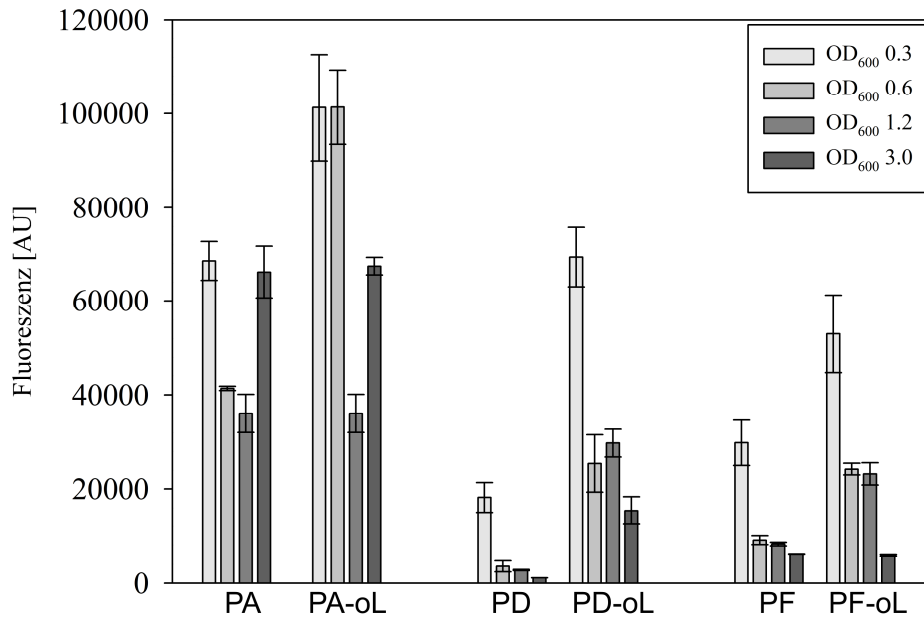


Abbildung 21: Auswirkung der 5'-UTR auf den Expressionsverlauf während des Wachstums. Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 16, 24, 36 und 48 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 0,3; 0,6; 1,2 und 3,0) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

In allen Fällen führte die Deletion der 5'-UTR zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Ein Zusammenhang zwischen der wachstumsabhängigen Expression und der *leader*-Bereiche wurde aber nur bei 5'-UTR_A der *p-gvpA*-mRNA festgestellt.

Tabelle 13: Auswirkung der 5'-UTR auf den Expressionsverlauf während des Wachstums.

Transformanten	Basale Aktivität / Fluoreszenz [AU] x 10 ^{3*}				
	OD ₆₀₀	0.3	0.6	1.2	3.0
PA		69 ± 4	41 ± 0,4	36 ± 4	66 ± 6
PA-oL		101 ± 11	101 ± 8	36 ± 4	67 ± 2
Faktor		1,4	2,5	1,0	1,0
PD		18 ± 3	4 ± 1	3 ± 0.1	1 ± 0,01
PD-oL		69 ± 6	25 ± 6	30 ± 3	15 ± 3
Faktor		3,8	6,3	10,0	15,0
PF		30 ± 5	9 ± 1	8 ± 0,4	6 ± 0,03
PF-oL		53 ± 8	24 ± 1	23 ± 2	6 ± 0,2
Faktor		1,8	2,7	2,9	1,0

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

4.2.5. Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} durch GvpE

Ein weiterer Regulator der p-vac ist der Transkriptionsaktivator GvpE. GvpE aktiviert die beiden Promotoren P_{pA} und P_{pD} und reguliert somit die Expression ausgehend der beiden Promotoren. Die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} benötigt jeweils einen 20 nt langen Abschnitt, die sogenannte UAS-Sequenz (*upstream activating sequence*), die sich innerhalb der 35 nt großen Region zwischen P_{pA} und P_{pD} befindet. Die UAS von P_{pA} (UAS_A) sowie P_{pD} (UAS_D) besteht aus zwei 8 nt langen Sequenzen (UAS_A 1/UAS_A 2 sowie UAS_D 1/UAS_D 2), die jeweils von 4 nt ohne Funktion getrennt werden. Während sich UAS_A 1 und UAS_D 1 im Zentrum der Region um 7 nt überlappen, befinden sich UAS_A 2 und UAS_D 2 jeweils 1 nt *upstream* des BR-Elements von P_{pA} bzw. P_{pD} (Bauer et al., 2008; Marschhaus and Pfeifer, 2012) (Abbildung 22).

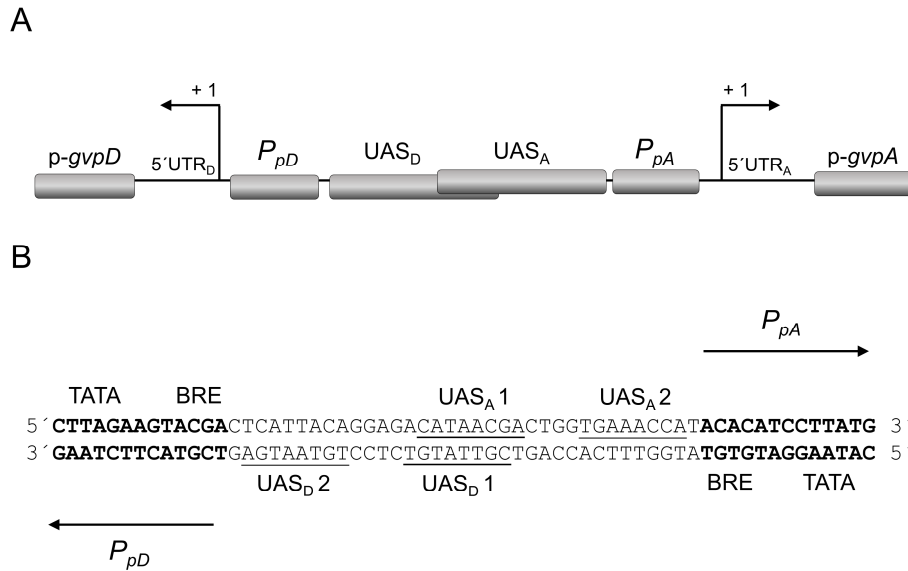


Abbildung 22: P_{pA} - P_{pD} -Promotorregion. **A:** Schematische Darstellung der P_{pA} - P_{pD} -Promotorregion. Innerhalb der 35-nt Sequenz zwischen P_{pA} und P_{pD} befinden sich die zur GvpE-vermittelten Aktivierung benötigten *upstream activating sequences* (UAS). Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. **B:** Sequenz der P_{pA} - P_{pD} -Promotorregion. Die einzelnen UAS Elemente sind jeweils durch 4 nt voneinander getrennt. Die beiden UAS₁ Elemente überlappen im Zentrum 7 nt, während die UAS₂ Elemente 1 nt *upstream* des jeweiligen BR-Elements lokalisiert sind.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} wie auch P_{pD} und der jeweiligen 5'-UTR festzustellen, wurde die Expression ausgehend von P_{pA} und P_{pD} in Gegenwart von cGvpE und auch in An- und Abwesenheit des 5'-UTR_A und 5'-UTR_D *in vivo* analysiert.

Hbt. salinarum PHH1 besitzt neben der Plasmid-kodierten p-vac- auch die chromosomal-kodierte c-vac-Region, die die gleiche Genanordnung aufweist (Horne et al., 1988; Horne et al., 1991). Der Transkriptionsaktivator cGvpE stammt von der c-vac-Region, bindet ebenfalls an die UAS und wurde aufgrund seiner stärkeren Aktivierungsfähigkeit anstelle von pGvpE (der p-vac-Region) gewählt (Gregor and Pfeifer, 2001). Das c-gvpE-Gen wurde über die Schnittstellen *NotI* und *XbaI* in pLacZJB18Δ inseriert.

Wegen seines konstitutiven Charakters wurde der P_{fdx} -Promotor zur Expression von *c-gvpE* verwendet und *via NotI* und *NheI* genau von *c-gvpE* eingefügt. Anschließend wurde die sehr GC-reiche *NotI*-Schnittstelle mittels Mutagenese-PCR mit der Erkennungssequenz von *SpeI* ausgetauscht. Um den P_{fdx} -Promotor von dem t.L11e-Terminator räumlich zu trennen wurde eine 594 nt lange nicht-kodierende Sequenz zwischen P_{fdx} und t.L11e inseriert. In *Hfx. volcanii* Transformanten mit den resultierenden Plasmiden pP_DP_AJB18Δ+E (bezeichnet als PDPA +E) und pP_AP_DJB18Δ+E (bezeichnet als PAPD +E) wurde cGvpE schließlich über eine Western Blot Analyse bestätigt (**Abbildung 23**).

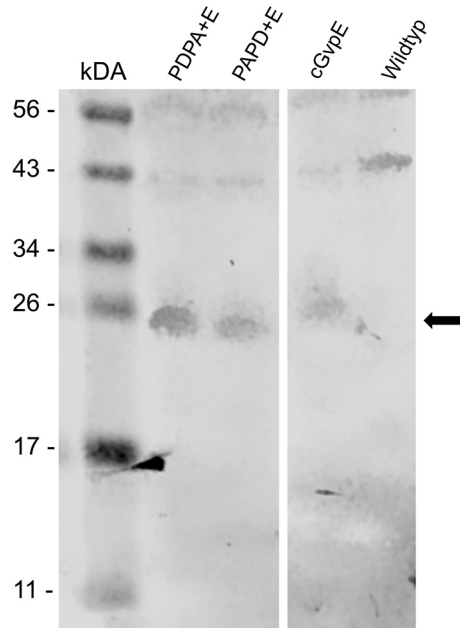


Abbildung 23: Western Analyse zum Nachweis von cGvpE in PDPA+E- und PAPD+E-Transformanten. Jeweils 20 mg Gesamtprotein wurden per SDS-PAGE separiert und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von cGvpE erfolgte mittels cGvpE-Antiserum sowie eines zweiten Antikörpers, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye 800 CW (LI-COR) gekoppelt wurde. Die Western Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert. Die erwartete Proteingröße ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Als Positivkontrolle diente isoliertes cGvpE-Protein, während Gesamtprotein von *Hfx. volcanii* WR340 Wildtyp als Negativkontrolle verwendet wurde. Als Marker wurde der Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder verwendet.

Aufgrund der hohen Aktivität von P_{pA} und P_{pD} in der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Fluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 Zellen mit pP_DP_AJB18Δ (bezeichnet als PDPA) und pP_DP_AJB18Δ+E (PAPD+E) sowie Transformanten mit pP_AP_DJB18Δ (PDPA) und pP2cE- x P_AP_DJB18Δ+E (PAPD+E) bei einer OD₆₀₀ von 0,6 (Inkubation: 42°C, 24 h) gemessen. Die Fluoreszenz von PDPA+E-Transformanten (179.000 AU) war 13-fach höher als das mGFP6-Signal der entsprechenden Zellen mit basaler P_{pA} Aktivität (14.000 AU). Im Fall von Zellen mit pPAPD+E (17.000 AU) wurde eine 9-fach höhere Fluoreszenz als bei PAPD-Transformanten (2.000 AU) detektiert. In Anwesenheit von GvpE besaß P_{pA} eine um 10,5-fach höhere Aktivität als P_{pD} *in vivo* (**Abbildung 24, Tabelle 14**).

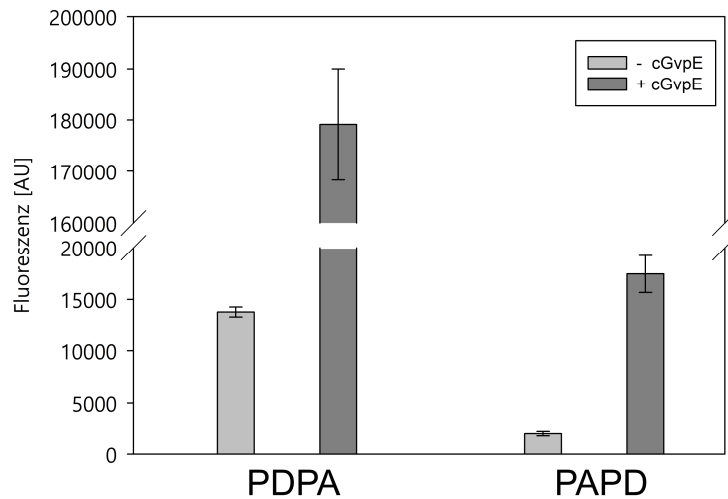


Abbildung 24: Effekt von cGvpE auf die P_{pA} - und P_{pD} -Aktivität *in vivo*. Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 24 h Inkubationszeit (OD_{600} von 0,6) gemessen und als *arbitrary units* (AU) relativ zueinander angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 14: cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} - P_{pA} und P_{pA} - P_{pD} .

Promotorregion	Basale Aktivität	+ GvpE	Faktor der Aktivierung
Fluoreszenz [AU] x 10 ³ *			
PDPA	14 ± 0,5	179 ± 11	13
PAPD	2 ± 0,2	17 ± 2	9

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

Im Vergleich zu den bereits getesteten Promotoraktivitäten war die Fluoreszenz der PDPA+E-Transformanten fast so hoch wie in Transformanten mit einer *mgfp6* Expression ausgehend des P_2 -Promotors (221.000 AU). Die hohe Aktivität von P_{fdx} (316.000 AU) wurde allerdings nicht erreicht. Im Vergleich zu P_{fdx} - und P_2 -Transformanten wurde in pPAPD+E Transformanten eine 18-fach bzw. 13-fach niedrigere Fluoreszenz detektiert (**Abbildung 25**).

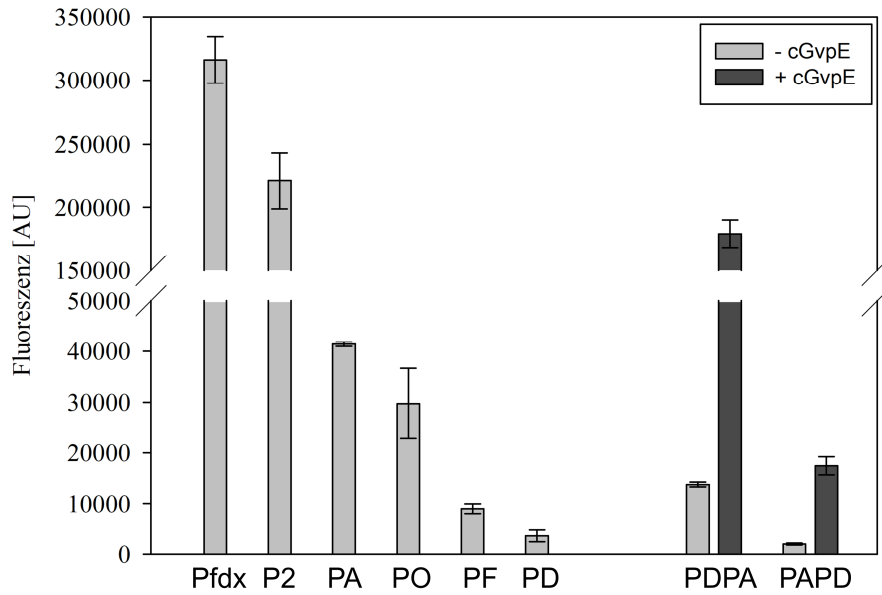
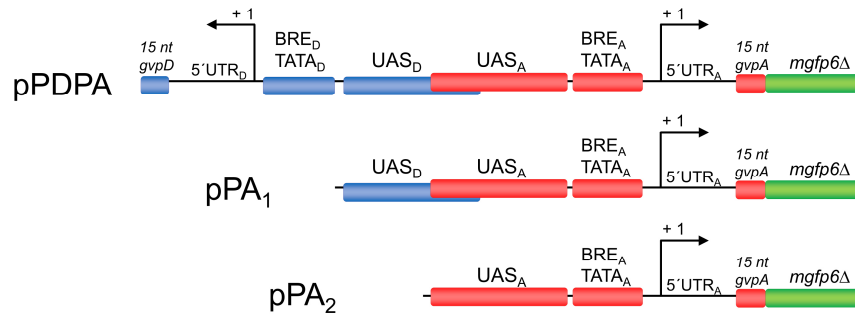


Abbildung 25: Vergleich der Aktivität der sechs verschiedenen haloarchaealen Promotoren mit der Aktivität von P_{pA} und P_{pD} bei Anwesenheit von cGvpE *in vivo*. Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 24 h Inkubationszeit (OD_{600} von 0,6) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die durch cGvpE induzierten P_{pA} - und P_{pD} -Aktivitäten sind rechts dargestellt. Die dafür verwendeten Konstrukte PDPA und PAPD umfassen die gesamte P_{pA} - P_{pD} bzw. P_{pA} - P_{pD} -Promotorregion. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Um die kleinstmögliche Einheit der intergenen Region, bei der die cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} noch gewährleistet ist zu identifizieren, wurden *mgfp6Δ*-Fusionskonstrukte mit Deletionen im 5'-Bereich der Promotorregion über hybridisierte Oligonukleotide hergestellt. Die unterschiedlichen Bereiche der Promotorregion wurden *via* *NcoI* und *BamHI* in pLacZJB18 und pLacZJB18+E mit *mgfp6Δ* fusioniert. Zur weiteren Charakterisierung der cGvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} wurden die Plasmide pPA1 von pPA2 verwendet (**Abbildung 26**). Während pPA1 die Sequenz der intergenen Region nach P_{pD} bis einschließlich der ersten 15 nt von *p-gvpA* fusioniert an *mgfp6Δ* enthielt, fehlte bei pPA2 UAS_D .

A



B

Promoter	Sequenz (5' → 3')	Konstrukt	Transformanten
$P_{pD}P_{pA}$	<p> <u> TAGATTGGGTGAACTCAT </u> TACTTCTCTCCAGTCGATGGCGGTAGAGCACTCC </p> <p> CGACTAGTAGGTGAGGCTTTCTTCGCTTACGACTGTCTAAGAAAGCTTTACAC </p> <p> TCTCCGTACTTAGAAGTACGACTCATTACAGGAGACATAACGA </p> <p> CTGGTGAAC </p> <p> CATACACATCCTTATGTGATGCCCGAGTATAGATGGGTTAATCCAGAT </p> <p> TCACCAATGGCGCAACCAAGAT </p> <p> GGATCCAGT...TAA </p>	$p_{pD}P_A$	PDPA
	<p> TAGATTGGGTGAACTCAT </p> <p> TACTTCTCTCCAGTCGATGGCGGTAGAGCACTCC </p> <p> CGACTAGTAGGTGAGGCTTTCTTCGCTTACGACTGTCTAAGAAAGCTTTACAC </p> <p> TCTCCGTACTTAGAAGTACGACTCATTACAGGAGACATAACGA </p> <p> CTGGTGAAC </p> <p> CATACACATCCTTATGTGATGCCCGAGTATAGATGGGTTAATCCAGAT </p> <p> TCACCAATGGCGCAACCAAGAT </p> <p> GGATCCAGT...TAA </p>	$p_{pD}P_A+E$	PDPA+E
$P_{pA}1$	<p> CTCTATTACAGGAGACATAACGA </p> <p> CTGGTGAACCATACACATCCTTATGTGATGC </p> <p> CCGAGTATAGTATAGATGGGTTAATCCAGATCACCAATGGCGCAACCAAGAT </p> <p> GGATCCAGT...TAA </p>	$p_{pA}1$	PA1
	<p> CTCTATTACAGGAGACATAACGA </p> <p> CTGGTGAACCATACACATCCTTATGTGATGC </p> <p> CCGAGTATAGTATAGATGGGTTAATCCAGATCACCAATGGCGCAACCAAGAT </p> <p> GGATCCAGT...TAA </p>	$p_{pA}1+E$	PA1+E
$P_{pA}2$	<p> GGAGACATAACGA </p> <p> CTGGTGAACCATACACATCCTTATGTGATGCCCGAGTAT </p> <p> AGTTAGAGATGGGTTAATCCAGATCACCAATGGCGCAACCAAGAT </p> <p> GGATCCAGT...TAA </p>	$p_{pA}2$	PA2
	<p> GGAGACATAACGA </p> <p> CTGGTGAACCATACACATCCTTATGTGATGCCCGAGTAT </p> <p> AGTTAGAGATGGGTTAATCCAGATCACCAATGGCGCAACCAAGAT </p> <p> GGATCCAGT...TAA </p>	$p_{pA}2+E$	PA2+E

Abbildung 26: Konstrukte zur Untersuchung der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} . A: Schematische Darstellung der Promotorregion-*mgfp6* Fragmente. Zur Untersuchung der Induktion von P_{pA} durch cGvpE wurden verschiedene Konstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten der intergenen Region inklusive der ersten 15 nt von *p-gvpA* upstream von *mgfp6*Δ (ohne ATG-Start) in pLacZJB18 (Bestimmung der Basalaktivität) und pLacZJB18+E (Aktivierung durch cGvpE) inseriert. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. B: DNA-Sequenzen des Fusionsbereiches. Erste 15 nt von *p-gvpD*: blau und fett. 5'-UTR_D: blau und kursiv. Transkriptionsstart: blau, kursiv und unterstrichen. P_{pD} -Promotor: blau. UAS_D2: blau und einfach unterstrichen. UAS_A1: rot und fett unterstrichen. UAS_A2: rot und einfach unterstrichen. P_{pA} -Promotor: rot. Transkriptionsstart: rot, kursiv und unterstrichen. 5'-UTR_A: rot und kursiv. Erste 15 nt von *p-gvpA*: rot und fett. Erkennungssequenz von *Bam*HI schwarz und unterstrichen. Die ersten drei Nukleotide des offenen Leserahmens von *mgfp6*Δ sowie dessen Stoppsignal sind in Grün hervorgehoben.

Die Quantifizierung der Fluoreszenz der Transformanten zeigte eine höhere *mgfp6*Δ-Expression bei Abwesenheit von P_{pD} -5'-UTR_D und den ersten 15 nt von *p-gvpD* (Abbildung 27, Tabelle 15). So besaßen PDPA-Transformanten (19.000 AU) ein 1,6-fach niedrigeres mGFP6Δ-Signal als Zellen mit pPA1 (29.000 AU) und eine 1,7-fach höhere Fluoreszenz als PA2-Transformanten (32.000 AU). In Anwesenheit von cGvpE wurde ein 11-fach höheres mGFP6Δ-Signal (PDPA+E, 206.000 AU) im Vergleich zu PDPA-

Transformanten ohne *c-gvpE* Expression detektiert. Im Fall von PA1+E- und PA2+E-Transformanten führte cGvpE jeweils zu einer 3,3-fachen Steigerung der Fluoreszenz im Vergleich zu den entsprechenden Zellen ohne Aktivator und somit zu einer deutlich niedrigeren Induzierung von P_{pA} durch cGvpE als in Anwesenheit des P_{pD} -5'-UTR_D-Fragments. Signifikante Unterschiede zwischen PA1- und PA2-Transformanten bzw. PA1+E- und PA2+E-Transformanten wurden nicht festgestellt (**Abbildung 27**, **Tabelle 15**).

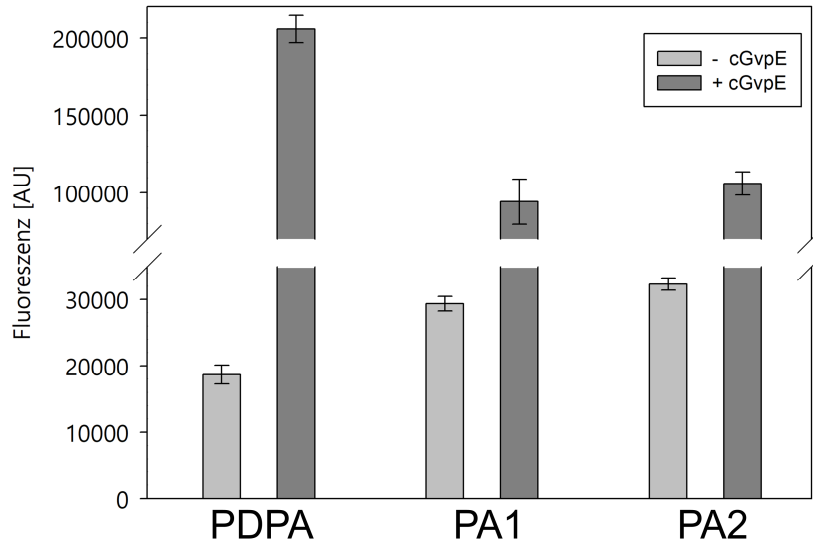


Abbildung 27: Effekt von cGvpE auf die P_{pA} Aktivität *in vivo*. Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 24 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 0,6) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 15: cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} - P_{pA} bzw. P_{pA} .

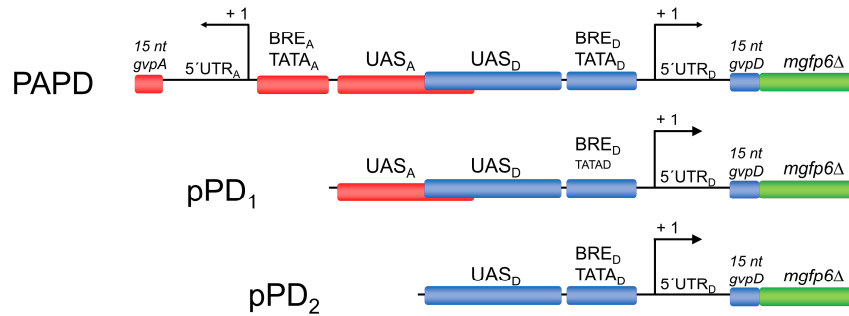
Promotorregion	Basale Aktivität	+ GvpE	Faktor der Aktivierung
Fluoreszenz [AU] x 10 ³ *			
PDPA	19 ± 1	206 ± 9	11
PA1	29 ± 1	94 ± 15	3,3
PA2	32 ± 1	106 ± 7	3,3

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

4.2.6. GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD}

In ähnlicher Weise wurde die cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} untersucht. Dazu wurden verschiedene Plasmide mit unterschiedlich langen Promotorfragmenten *inklusive der ersten 15 nt von p-gvpD* via *NcoI* und *BamHI* in *pLacZJB18* und *pLacZJB18+E* *genau* von *mgfp6Δ* inseriert (**Abbildung 28**). Die resultierenden Plasmide enthielten im Vergleich zu pPAPD die intergene Region nach P_{pA} (pPD1) bzw. nach UAS_D 1 (pPD2) bis einschließlich der ersten 15 nt von *p-gvpD* *upstream* von *mgfp6Δ*. Als Kontrolle bei der Quantifizierung der Fluoreszenz dienten Zellen, die pPAPD und pPAPD+E enthielten.

A



B

Promoter	Sequenz (5' → 3')	Konstrukt	Transformanten
$P_{pA}P_{pD}$	ATCTGGTTGCGCCATTGGTGATCTGGGATTACCCATCTCTAACTATACTCGG GCATCACATAAGGATGTATGGTTTCCACAGTCGTTATGCTCTCCTGTAATGAG TCGTACTTTCTAAGTACGGAGAGGTAAAGCTTCTTAGACAGTCGTGAAGCGAA GAAAGCCTCACCTACTAGTCGGGAGTGCTCTACCGCCATCGACTGGAGAGAA GTAATGAGTTCACCCAATGGATCCAGT...TAA	pPAPD	PAPD
		pPAPD+E	PAPD+E
$P_{pD} 1$	ATGGTTTCCAGTCGTTATGCTCTCCTGTAATGAGTCGTACTTCTAAGTACGGA GAGTGTAAGCTTCTTAGACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCTCACCTACTAG TCGGGAGTGCTCTACCGCCATCGACTGGAGAGAAGTAATGAGTTCACCCAAT GGATCCAGT...TAA	pPD1	PD1
		pPD1+E	PD1+E
$P_{pD} 2$	CCAGTCGTTATGCTCTCCTGTAATGAGTCGTACTTCTAAGTACGGAGAGGTGTA AGCTTCTTAGACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCTCACCTACTAGTCGGGAGT GCTCTACCGCCATCGACTGGAGAGAAGTAATGAGTTCACCCAATGGATCCAGT T...TAA	pPD2	PD2
		pPD2+E	PD2+E

Abbildung 28: Konstrukte zur Untersuchung der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pD} . **A:** Schematische Darstellung der Promotorregion-*mgfp6* Fragmente. Zur Untersuchung der Induktion von P_{pD} durch cGvpE wurden verschiedene Fusionskonstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten der intergenen Region inklusive der ersten 15 nt von *p-gvpD* *upstream* von *mgfp6Δ* (ohne ATG-Start) in *pLacZJB18* (Bestimmung Basalaktivität) und *pLacZJB18+E* (Aktivierung durch cGvpE) inseriert. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. **B:** DNA-Sequenzen des Fusionsbereiches. Erste 15 nt von *p-gvpA*: rot und fett. 5'-UTRA: rot und kursiv. P_{pA} -Promotor: rot. UAS_A2: rot und einfach unterstrichen. UAS_D2: blau und einfach unterstrichen. UAS_D1: blau und fett unterstrichen. P_{pD} -Promotor: blau. Transkriptionsstart *p-gvpD*: blau, kursiv und unterstrichen. 5'-UTR_D: blau und kursiv. Erste 15 nt von *p-gvpD*: blau und fett. Erkennungssequenz von *BamHI* schwarz und unterstrichen. Die ersten drei Nukleotide des offenen Leserahmens von *mgfp6Δ* sowie dessen Stopcodon sind in Grün hervorgehoben.

Mit 2.700 AU besaßen PAPD-Transformanten eine niedrigere Fluoreszenz als Zellen mit pP_D1 (5.400 AU) bzw. pP_D2 (5.000 AU), die das P_{pA}-5'-UTR_D-Fragment inklusive der ersten 15 nt von p-gvpA nicht enthielten. In Gegenwart von cGvpE wurde bei PAPD+E-Transformanten (21.000 AU) ein 8-fach höheres mGFP6A-Signal im Vergleich zu Zellen mit pP_AP_D gemessen. Während PD1+E-Transformanten (40.000 AU) eine 7-fach höhere Fluoreszenz im Vergleich zu den entsprechenden Zellen ohne cGvpE zeigten, fluoreszierten PD2+E-Transformanten etwa 8-fach stärker (38.000 AU) als Zellen mit pP_D2 (**Abbildung 29, Tabelle 16**).

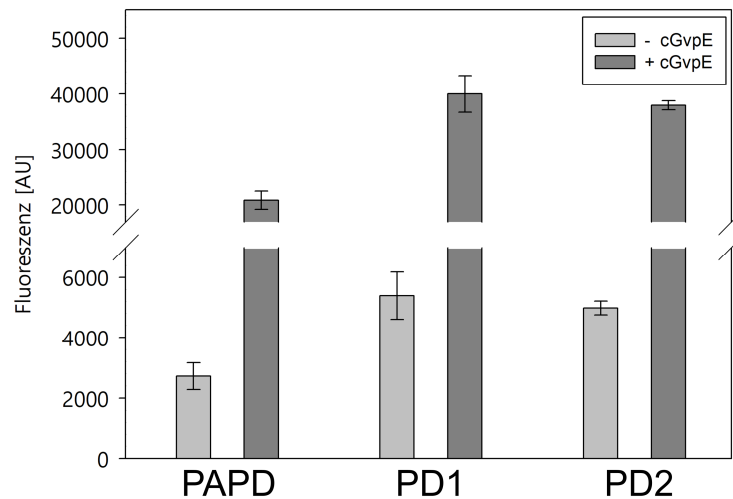


Abbildung 29: Effekt von cGvpE auf die P_{pD} Aktivität *in vivo*. Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 24 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 0,6) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 16: cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA}-P_{pD} bzw. P_{pD}.

Promotorregion	Basale Aktivität	+ GvpE	Faktor der Aktivierung
Fluoreszenz [AU] x 10 ^{3*}			
PAPD	3 ± 0,4	21 ± 2,0	7,7
PD1	5 ± 0,8	40 ± 3,0	7,4
PD2	5 ± 0,2	38 ± 0,8	7,6

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

4.2.7. Rolle von 5'-UTR_A und 5'-UTR_D bei der GvpE-vermittelten Aktivierung

Die beschriebenen Analysen zeigten einen möglichen Einfluss des *leader*-Bereichs von p-gvpD bei der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} und P_{pD}. Daher wurde eine mögliche Wechselwirkung von cGvpE und 5'-UTR_A bzw. 5'-UTR_D analysiert.

Potentielle Bindung zwischen GvpE und 5'-UTR_A

Um einen möglichen Einfluss von 5'-UTR_A auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} zu untersuchen, wurden die Sequenzen der intergenen Region von pPDPA und pPA2 ohne 5'-UTR_A inklusive der ersten 15 nt von p-gvpA in pLacZJB18 und pLacZJB18+E mit *mgfp6Δ* fusioniert (Abbildung 30).

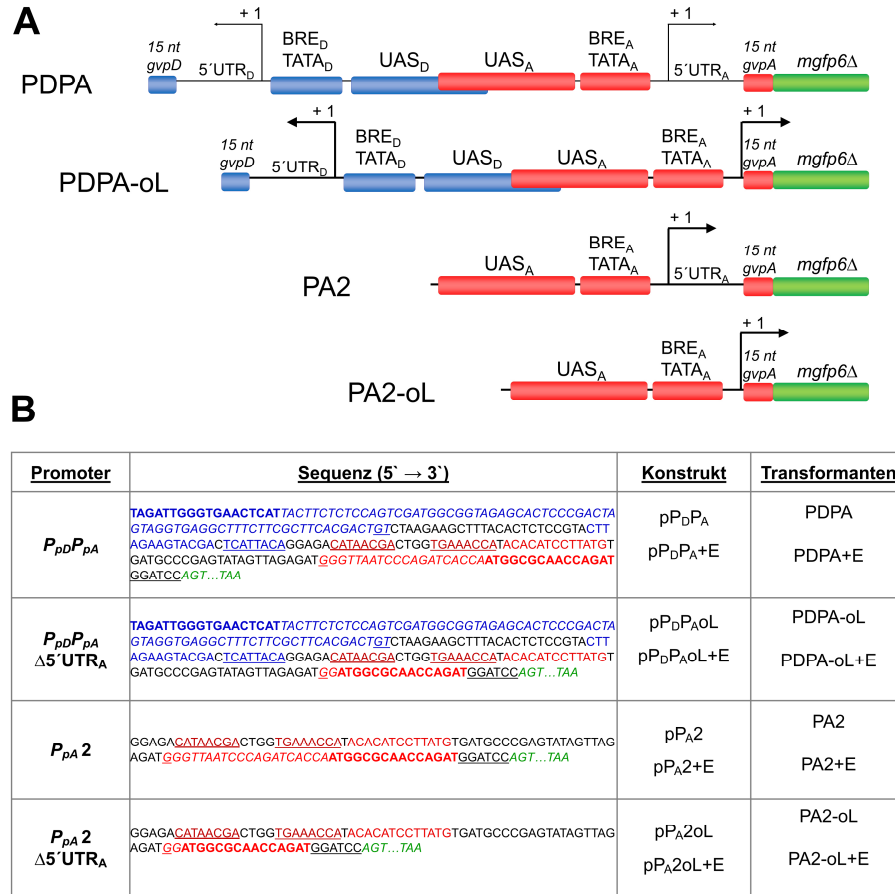


Abbildung 30: Fusionskonstrukte zur Untersuchung des Einflusses von 5'-UTR_A auf die GvpE-vermittelte Aktivierung des P_{pA} -Promotors A: Schematische Darstellung der Promotorregion-*mgfp6* Fragmente. Zur Untersuchung des Einflusses der 5'-UTR_A auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} wurden die Sequenzen der intergenen Region von pPDPA und pPA2 sowie pPAPD ohne 5'-UTR_A in pLacZJB18 und pLacZJB18+E mit *mgfp6Δ* fusioniert. Die Konstrukte ohne 5'-UTR_A werden zusätzlich mit -oL bezeichnet. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. B: DNA-Sequenzen des Fusionsbereiches. Erste 15 nt von p-gvpD: blau und fett. 5'-UTR_D: blau und kursiv. Transkriptionsstart: blau, kursiv und unterstrichen. P_{pD} -Promotor: blau. UAS_D2: blau und einfach unterstrichen. UAS_A1: rot und fett unterstrichen. UAS_A2: rot und einfach unterstrichen. P_{pA} -Promotor: rot. Transkriptionsstart: rot, kursiv und unterstrichen. 5'-UTR_A: rot und kursiv. Erste 15 nt von p-gvpA: rot und fett. Erkennungssequenz von *Bam*HI schwarz und unterstrichen. Die ersten drei Nukleotide des offenen Leserahmens von *mgfp6Δ* sowie dessen Stopcodon sind in Grün hervorgehoben.

Die Fluoreszenz der resultierenden Transformanten wurde verglichen (**Abbildung 31, Tabelle 17**). Die höchste Fluoreszenz wurde mit 750.000 AU bei Transformanten ohne 5'-UTR_A und mit cGvpE (PDPA-oL+E) detektiert. Bei Anwesenheit der 5'-UTR_A wurde ein 3,6-fach niedrigeres GFP-Signal gemessen (pPDPA+E; 206.000 AU). Im Vergleich der PDPA- und PDPA-oL-Transformanten wurde bei Anwesenheit von cGvpE eine 11-fach höhere bzw. 14-fach höhere Fluoreszenz gemessen. Die hohe Aktivierung von P_{pA} durch cGvpE wurde beim Fehlen der P_{pD} -5'-UTR_D-Sequenz also nicht beobachtet. Die PA2+E-Transformanten (ohne P_{pD} Promotersequenz) zeigten ein 3,3-fach und PA2-oL+E-Transformanten (ohne P_{pD} -Promoter und ohne 5'-UTR_A) ein 2,8-fach höheres GFP-Signal als Zellen mit pPA2 bzw. pPA2-oL ohne cGvpE (**Abbildung 31, Tabelle 17**).

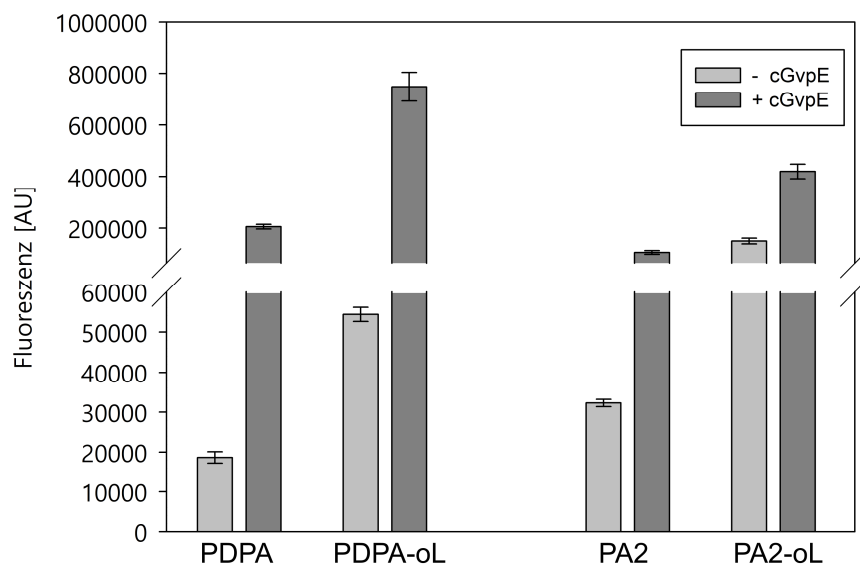


Abbildung 31: Einfluss der 5'-UTR_A auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} . Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 24 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 0,6) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 17: cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} .

Promotorregion	Basale Aktivität	+ GvpE	Faktor der Aktivierung
Fluoreszenz [AU] x 10 ^{3*}			
PDPA	19 ± 1	206 ± 9	11
PDPA-oL	54 ± 2	748 ± 56	14
PA2	32 ± 0,9	106 ± 7	3,3
PA2-oL	150 ± 1	420 ± 28	2,8

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

Potentielle Bindung zwischen GvpE und 5'-UTR_D

Auch für P_{pD} wurde die cGvpE-vermittelte Aktivierung und der Beitrag der 5'-UTRD untersucht. Dazu wurden die Sequenzen der intergenen Region von pPAPD und pPD2 ohne 5'-UTRD inklusive der ersten 15 nt von p-gvpD in pLacZJB18 und pLacZJB18+E mit mgfp6Δ fusioniert (Abbildung 32).

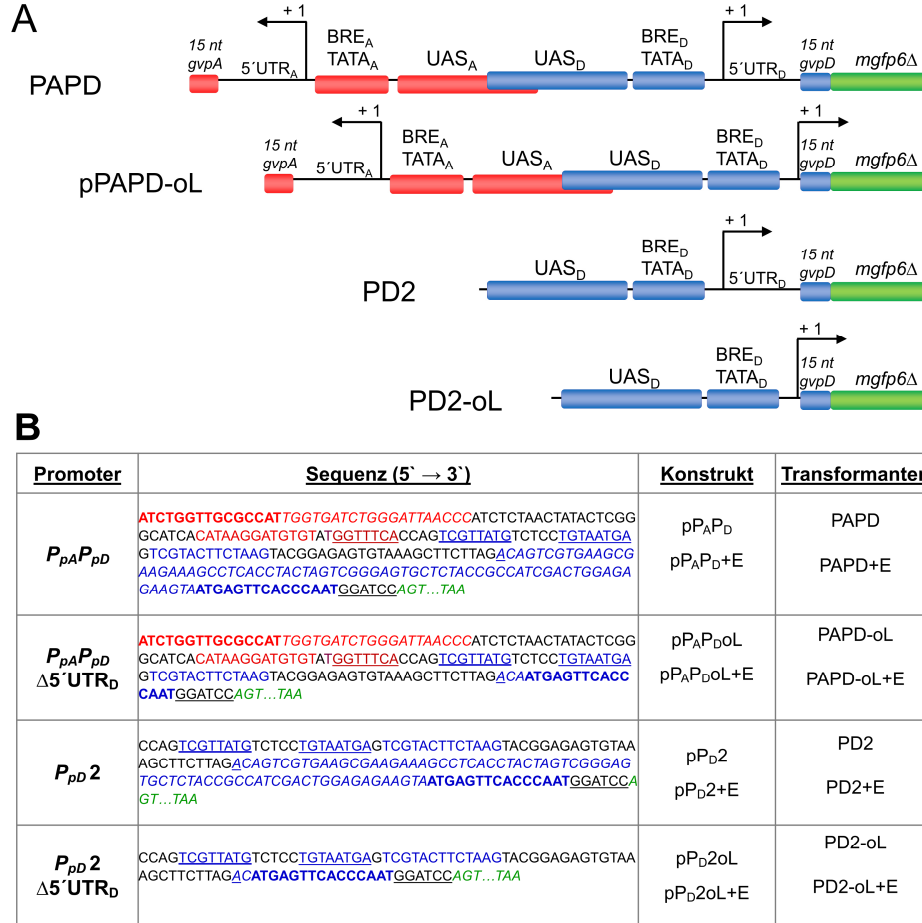


Abbildung 32: Fusionskonstrukte zur Untersuchung des Einflusses von 5'-UTR_D auf die GvpE-vermittelte Aktivierung des P_{pD} -Promotors. **A:** Schematische Darstellung der Promotorregion-mgfp6 Fragmente. Zur Untersuchung des Einflusses der 5'-UTR_D auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} wurden verschiedene lange Bereiche der Promotorregion ohne 5'-UTR_D in pLacZJB18Δ und pLacZJB18Δ+E mit mgfp6Δ fusioniert. Die Konstrukte ohne 5'-UTR_D werden zusätzlich mit -oL bezeichnet. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. **B:** DNA-Sequenzen des Fusionsbereiches. Erste 15 nt von p-gvpA: rot und fett. 5'-UTR_A: rot und kursiv. Transkriptionsstart p-gvpA: rot, kursiv und unterstrichen. P_{pA} -Promotor: rot. UAS_A2: rot und einfach unterstrichen. UAS_D2: blau und einfach unterstrichen. UAS_D1: blau und fett unterstrichen. P_{pD} -Promotor: blau. Transkriptionsstart p-gvpD: blau, kursiv und unterstrichen. 5'-UTR_D: blau und kursiv. Erste 15 nt von p-gvpD: blau und fett. Erkennungssequenz von BamHI schwarz und unterstrichen. Die ersten drei Nukleotide des offenen Leserahmens von mgfp6Δ sowie dessen Stopcodon sind in Grün hervorgehoben.

Die Quantifizierung des GFP-Signals ergab deutlich geringere Fluoreszenzen als bei der Aktivierung von P_{pA} durch cGvpE. Hier wurde die höchste Fluoreszenz mit 127.000 AU bei Zellen mit pPAPD-oL+E gemessen, was einer 5-fachen Induktion von P_{pD} durch cGvpE entsprach (PAPD-oL-Transformanten: 26.000 AU). Mit 114.000 AU wurde bei Zellen mit pPD2-oL+E eine ähnlich hohe Fluoreszenz detektiert. Im Vergleich zu PD2-oL-Transformanten ohne cGvpE (34.000 AU) wurde ein 3-fach höheres mGFP6Δ-Signal nachgewiesen. Eine stärkere cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} wurde bei Anwesenheit des 5'-UTR_D beobachtet. So besaßen PAPD+E-Transformanten mit 29.000 AU eine um 15-fach höhere Fluoreszenz als PAPD Transformanten (2.000 AU) und Zellen mit pPD2+E mit 53.000 AU ein 13-fach stärkeres GFP-Signal im Vergleich zu PD2-Transformanten (4.200 AU) (**Abbildung 33, Tabelle 18**).

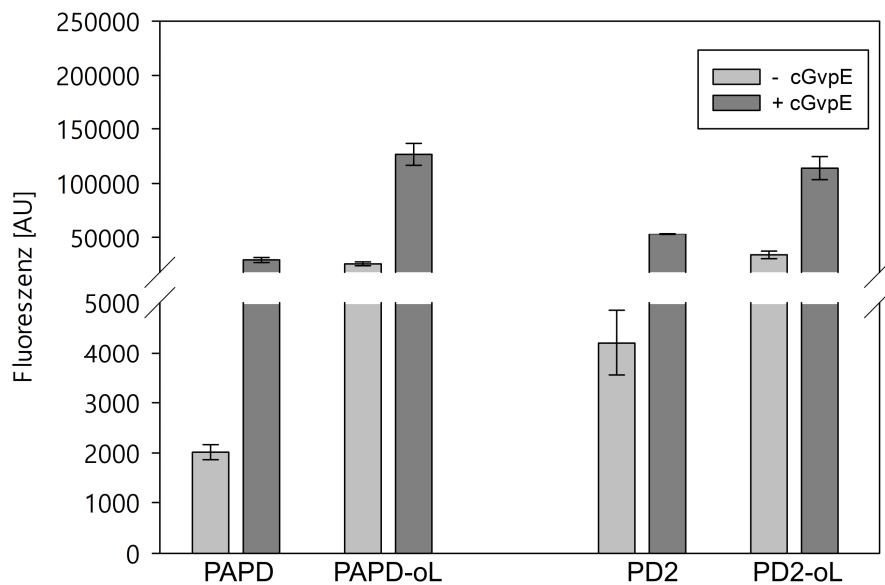


Abbildung 33: Einfluss von 5'-UTR_D auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} . Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 24 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 0,6) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 18: cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} .

Promotorregion	Basale Aktivität	+ GvpE	Faktor der Aktivierung
Fluoreszenz [AU] x 10 ^{3*}			
PAPD	2 ± 0,1	29 ± 2	15
PAPD-oL	26 ± 2	127 ± 10	5
PD2	4 ± 0,6	53 ± 0,8	13
PD2-oL	34 ± 3	113 ± 11	3,3

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

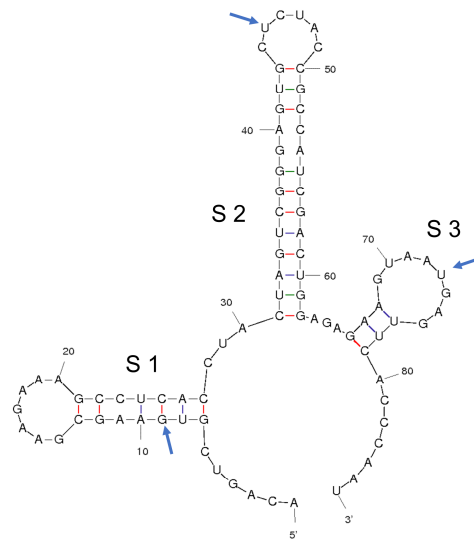
Zusammenfassend wurde ein Einfluss des *leader*-Bereichs von *p-gvpD* auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} festgestellt, während die 5'-UTR_A keinen Einfluss auf die Aktivierung durch GvpE hatte. Eine mögliche Interaktion von GvpE und 5'-UTR_D wurde genauer untersucht.

Deletion der 5'-UTR_D von p-gvpD

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben zeigte sich eine verminderte GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} beim Fehlen von P_{pD} , der 5'-UTR_D und den ersten 15 nt von p-gvpD. Im Fall von P_{pD} wurde ebenfalls eine schwächere Induktion des Promotors bei Abwesenheit des *leader*-Bereichs von p-gvpD festgestellt. Ein Einfluss der ersten 15 nt von p-gvpD und P_{pD} wurde ausgeschlossen, weswegen der Fokus der Untersuchung auf der Rolle der 5'-UTR_D bei der Aktivierung durch GvpE lag.

Da GvpE und 5'-UTR_D die Stärke der Genexpression auf unterschiedlichen Ebenen regulieren, wurde eine mögliche Interaktion beider Komponenten, die zu einer stärkeren GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} führt, angenommen. Um mögliche Sekundärstrukturen von 5'-UTR_D sowie putativen Erkennungssequenzen von GvpE innerhalb von 5'-UTR_D zu lokalisieren, wurden *in silico*-Analysen durchgeführt. Zur Vorhersage von Sekundärstrukturen in 5'-UTR_D sowie der ersten 15 nt von p-gvpD wurde „RNA Folding Form (version 2.3 energies)“ des mfold Web Servers (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3>, 25.07.2018; 16:14) verwendet. Die Analyse erfolgt durch die Berechnung der möglichen RNA-Faltung bei einer bestimmten Temperatur in Bezug auf die minimale freie Faltungsenergie nach dem Algorithmus von Walter et. al, 1994. Als Temperatur wurden 42 °C gewählt, was der Anzuchttemperatur der *Hfx. volcanii* Transformanten entspricht. Der Abgleich der Basenabfolge der 5'-UTR_D mit den Sequenzen der vier UAS-Elemente geschah mittels der Molekularbiologie-Software „Serial Cloner“.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur der 5'-UTR_D sowie der Abgleich der DNA-Sequenz des *leader*-Bereichs mit den einzelnen UAS-Elementen zeigten drei putative *stem-loop* Strukturen, innerhalb deren sich potentielle Erkennungssequenzen von GvpE befinden könnten (**Abbildung 34**). Während UAS_A 2 (75% Ähnlichkeit) sowie UAS_D 1 und 2 (jeweils 62,5% Ähnlichkeit) die höchste Übereinstimmung in der Anfangssequenz von *stem-loop* 1 (S1) besitzen, weist UAS_A 1 eine 50%ige Sequenzähnlichkeit im mittleren Bereich von *stem-loop* 2 (S2) auf. In *stem-loop* 3 (S3) wurde UAS_A 1 und UAS_D 1 jeweils mit einer 62,5%igen und UAS_D 2 mit einer 87,5%igen Übereinstimmung nachgewiesen. Somit zeigte sich eine relativ hohe Übereinstimmung der jeweiligen UAS innerhalb der drei *stem-loops* von 5'-UTR_D, was auf putative GvpE-Erkennungssequenzen innerhalb dieser Sekundärstrukturen schließen ließ.



B

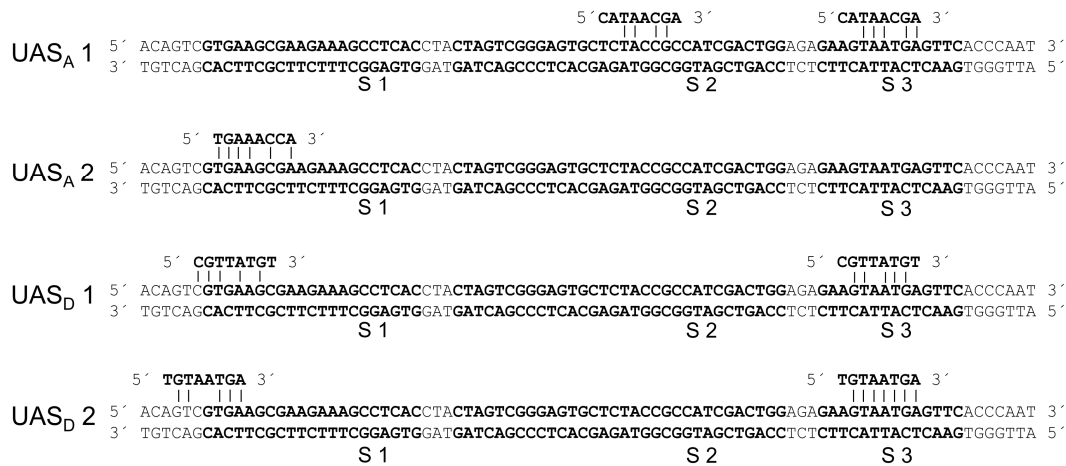
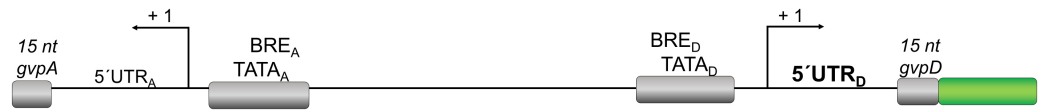


Abbildung 34: Analyse der Sekundärstruktur von 5'-UTR_D. **A:** Strukturvorhersage von 5'-UTR_D. Die Strukturanalyse erfolgte mittels des „RNA Folding Form (version 2.3 energies)“ des mfold Web Servers. Als Temperatur zur Analyse wurden 42 °C gewählt. Der berechnete ΔG -Wert betrug - 17,12 kcal/mol. Gezeigt sind die beiden Positionen mit der höchsten Übereinstimmung. Die Pfeile zeigen die Position der jeweiligen UAS-ähnlichen Sequenzen. Rote Striche stellen GC-Basenpaarungen, grüne Striche UG-Basenpaarungen und blaue Striche UA-Basenpaarungen dar. **B:** Abgleich der 5'-UTR_D-DNA-Sequenz mit den jeweiligen UAS-Elementen. Fett: Sequenz der *stem-loop* Strukturen. S1: *stem-loop* 1. S2: *stem-loop* 2. S3: *stem-loop* 3.

Zur Untersuchung der Funktion der Struktur von 5'-UTR_D bei der GvpE-vermittelten Aktivierung von *P_{PD}* wurden Konstrukte basierend auf pPAPD und pPAPD+E hergestellt, die anstelle der Sequenz von S1, S2 und/oder S3 CAA-*Repeats* enthielten (**Abbildung 35 A und B**).

A



B

	S1	S2	S3
pPAPD	5' ACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCTCACCTACTAGTCGGGAGTGCTCTACCGCCATCGACTGGAGAGAAGTAATGAGTTACCCCAAT 3'		
pCAA 1	5' ACAGTCCAACAACAACAACAACAACAACCTACTAGTCGGGAGTGCTCTACCGCCATCGACTGGAGAGAAGTAATGAGTTACCCCAAT 3'		
pCAA 2	5' ACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCTCACCTACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGAGAAGTAATGAGTTACCCCAAT 3'		
pCAA 1,2	5' ACAGTCCAACAACAACAACAACAACAACCTACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGAGAAGTAATGAGTTACCCCAAT 3'		
pPAPD	5' ACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCTCACCTACTAGTCGGGAGTGCTCTACCGCCATCGACTGGAGAGAAGTAATGAGTTACCCCAAT 3'		
pCAA 3	5' ACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCTCACCTACTAGTCGGGAGTGCTCTACCGCCATCGACTGGAGACAACAAATGCAACAACCCCAAT 3'		
pCAA 1,3	5' ACAGTCCAACAACAACAACAACAACAACCTACTAGTCGGGAGTGCTCTACCGCCATCGACTGGAGACAACAAATGCAACAACCCCAAT 3'		
pCAA 2,3	5' ACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCTCACCTACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGACAACAAATGCAACAACCCCAAT 3'		
pCAA 1,2,3	5' ACAGTCCAACAACAACAACAACAACAACCTACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGACAACAAATGCAACAACCCCAAT 3'		

Abbildung 35: Konstrukte zur Untersuchung des Einflusses der Sekundärstrukturen S1, S2 und S3 in der 5'-UTR_D auf die Aktivierung durch cGvpE. A: Schematische Darstellung des Ausgangskonstrukts. Grün: *mgfp6*-Leserahmen. Der Transkriptionsstart ist mit +1 gekennzeichnet. B: DNA-Sequenzen der veränderten 5'-UTR_D Sequenzen inklusive der ersten 15 nt von p-*gvpD* innerhalb der Fusionskonstrukte. S1: *stem-loop* 1, S2: *stem-loop* 2, S3: *stem-loop* 3. Grau: CAA-Repeats. Schwarz, fett und unterstrichen: ATG-Start von p-*gvpD*.

Die unterschiedlichen DNA-Fragmente wurden über Oligonukleotide hergestellt und *via HindIII* und *BamHI* mit dem Bereich, der für die 5'-UTR_D codiert, jeweils mit *mgfp6Δ* fusioniert. Die CAA-Wiederholungen wurden gewählt, da diese Sequenzen keine RNA-Strukturen ausbilden (Hanson et al., 2003) und so die *stem-loop* Struktur aufgehoben werden kann ohne den Abstand zwischen Transkriptions- und Translationsstart zu verändern. Die Strukturanalyse der unterschiedlichen 5'-UTR_D-CAA-mRNAs erfolgte mittels *mfold*. Durch den Austausch aller drei *stem-loop* Sequenzen mit CAA-Repeats entstand im Anfangsbereich der 5'-UTR_D eine neue Sekundärstruktur aus 10 nt (**Abbildung 36**).

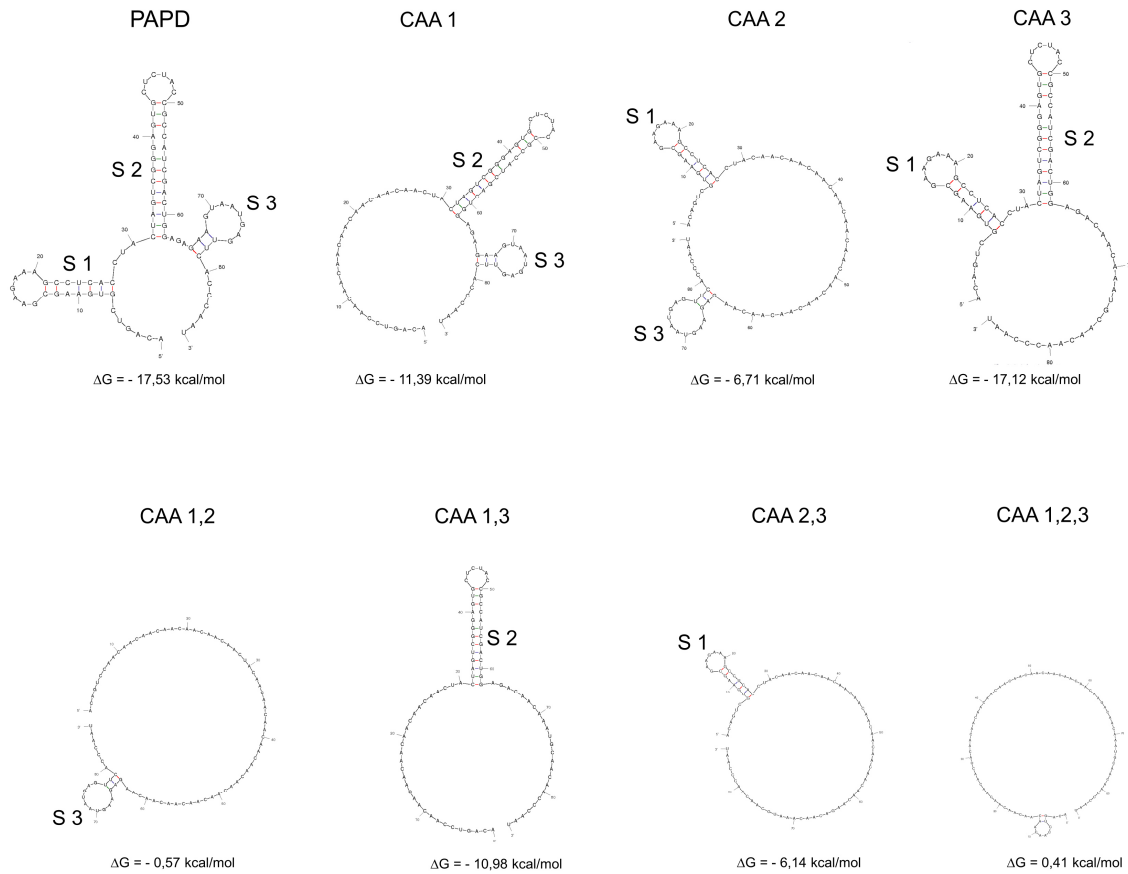


Abbildung 36: RNA-Strukturvorhersage für die 5'-UTR_D-CAA-Fragmente inklusive der ersten 15 nt von *p-gvpD*. Die Strukturanalyse erfolgte mittels des „RNA Folding Form (version 2.3 energies)“ des mfold Web Servers. Angenommen wurde eine Temperatur von 42°C.

Die generierten Plasmide mit einem CAA-Austausch von S1 werden mit pCAA1 bzw. pCAA1+E bezeichnet, während Vektoren, bei denen S2 mit CAA-Repeats ersetzt wurde, mit pCAA2 bzw. pCAA2+E und im Fall von S3 mit pCAA3 bzw. pCAA3+E benannt werden. Die Konstrukte mit einem Austausch von zwei *stem-loops* mit CAA-Repeats werden dann entsprechend als pCAA1,2 bzw. pCAA1,2+E, pCAA1,3 bzw. pCAA1,3+E oder pCAA2,3 bzw. pCAA2,3+E bezeichnet. Die beiden Konstrukte mit allen drei ausgetauschten *stem-loops* werden als pCAA1,2,3 bzw. pCAA12,3+E bezeichnet (Tabelle 19).

Tabelle 19: Übersicht der jeweiligen pCAA-Konstrukte. S1: Sekundärstruktur 1, S2: Sekundärstruktur 2 und S3: Sekundärstruktur 3.

Konstrukt	S1	S2	S3	Konstrukt	S1	S2	S3
pCAA1	X	✓	✓	pCAA1,2+E	X	X	✓
pCAA1+E*	X	✓	✓	pCAA1,3	X	✓	X
pCAA2	✓	X	✓	pCAA1,3+E	X	✓	X
pCAA2+E*	✓	X	✓	pCAA2,3	✓	X	X
pCAA3	✓	✓	X	pCAA2,3+E	✓	X	X
pCAA3+E*	✓	✓	X	pCAA1,2,3	X	X	X
pCAA1,2	X	X	✓	pCAA1,2,3+E	X	X	X

*+E = zusätzlich *c-gvpE*-Gen unter Kontrolle von P_{gdx}

Zur Quantifizierung des GFP-Signals der resultierenden Transformanten wurden diese bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,6 bei 42 °C angezogen. Als Kontrolle dienten PAPD- bzw. PAPD+E- sowie PAPD-oL- bzw. PAPD-oL+E-Transformanten. Die Auflösung der *stem-loops* durch die CAA-Repeats führte zu einer höheren Basalaktivität und bei Anwesenheit von GvpE zu einer niedrigeren Aktivierung (Faktor 5 anstelle von Faktor 12; **Abbildung 37, Tabelle 20**). Bei allen PAPD-CAA Varianten wurde eine höhere Fluoreszenz im Vergleich zu Transformanten mit der Wildtyp-Promotorregion $P_{pA}-P_{pD}$ detektiert (**Abbildung 37, Tabelle 20**). Während PAPD-Transformanten eine 12-fach höhere Fluoreszenz als PAPD+E-Transformanten besaßen, zeigten die CAA1+E- und CAA1,2+E-Transformanten nur ein 2-fach höheres GFP-Signal und CAA2+E-Transformanten eine 7-fach höhere Fluoreszenz im Vergleich zu CAA2-Transformanten ohne cGvpE. Die höchste Fluoreszenz mit 179.000 AU wiesen Zellen mit pPAPD-oL+E auf, bei denen ein 4,8-fach höheres GFP-Signal als bei PAPD-oL-Transformanten detektiert wurde (**Abbildung 37, Tabelle 20**).

Die Quantifizierung der Fluoreszenz zeigte bei Auflösung von S3 generell ein erhöhtes GFP-Signal. So besaßen CAA3-Transformanten eine 3-fach höhere Fluoreszenz als PAPD Transformanten, während CAA1,3- und CAA2,3-Transformanten ein 2-fach stärkeres mGFP6Δ-Signal und CAA1,2,3-Transformanten eine 5-fach höhere Fluoreszenz als die entsprechenden Transformanten mit Konstrukten mit 5'-UTR_D ohne S3 aufwiesen (**Abbildung 37, Tabelle 20**). Die gemessene cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} war, außer beim Fehlen von S1, bei Abwesenheit von S3 deutlich höher als bei Anwesenheit der Sekundärstruktur 3. So führte die Auflösung von S3 alleine und in Kombination mit S2 jeweils zu einer 11-fach stärkeren Fluoreszenz *in vivo*, was einer 5,5-mal so hohen cGvpE-vermittelten Aktivierung als in Gegenwart von S3 entspricht. Die stärkere cGvpE-vermittelte Aktivierung in Abwesenheit von S3 wurde

bei einer zusätzlichen Auflösung von S1 nicht mehr beobachtet. So wiesen CAA1,3+E- wie auch CAA1+E-Transformanten beide nur eine 2-fach höhere Fluoreszenz als Zellen ohne cGvpE (CAA1,3 und CAA1) auf. Das Auflösen aller drei *stem-loops* sowie die Auflösung von S1 und S2 führte in Gegenwart von cGvpE in beiden Fällen zu einer 5-fach stärkeren Fluoreszenz *in vivo* als ohne cGvpE (Abbildung 37, Tabelle 20).

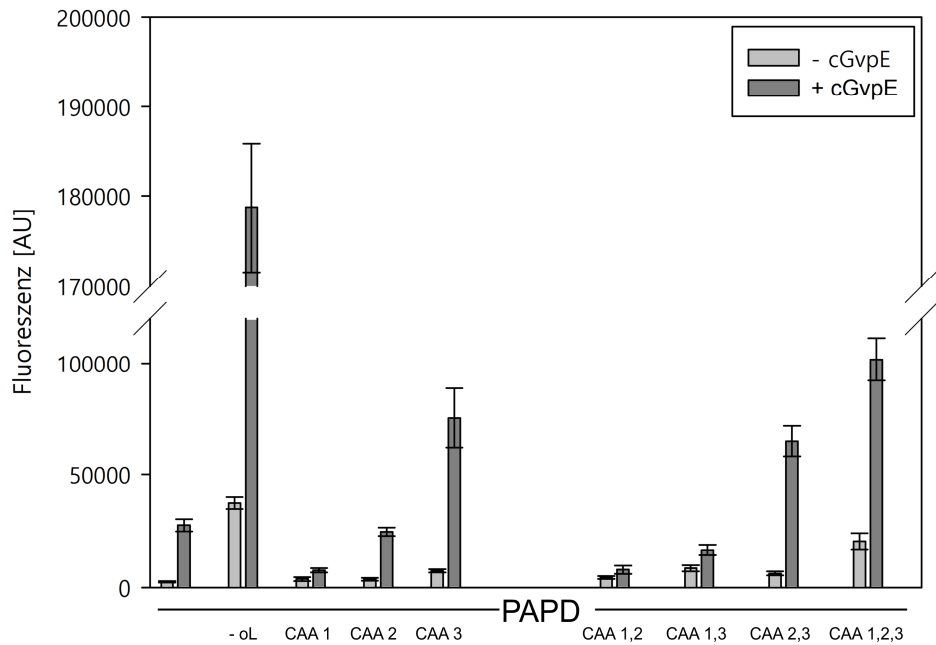


Abbildung 37: Einfluss der *stem-loops* S1, S2 und S3 der 5'-UTR_D auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von *P_{PD}*. Zur Analyse wurde die Sequenz von S1 und/oder S2 mit CAA-Repeats ausgetauscht. CAA1: Austausch von S1. CAA2: Austausch von S2. CAA1,2: Austausch von S1 und S2. CAA3: Austausch von S3. CAA1,3: Austausch von S1 und S2. CAA2,3: Austausch von S2 und S3. CAA1,2,3: Austausch von S1, S2 und S3. oL: ohne leader. Die Fluoreszenz der verschiedenen Transformanten wurde nach 24 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 0,6) gemessen und als *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 20: Einfluss der *stem-loops* S1, S2 und S3 von 5'-UTR_D auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von *P_{PD}*.

Promotorregion	Basale Aktivität	+ GvpE	Faktor der Aktivierung
Fluoreszenz [AU] x 10 ³ *			
PAPD	2 ± 0,3	27 ± 3	12
PAPD-oL	37 ± 3	179 ± 7	5
CAA1	4 ± 0,8	7 ± 1	2
CAA2	4 ± 0,6	25 ± 2	7
CAA3	7 ± 0,7	76 ± 13	11
CAA1,2	4 ± 0,5	8 ± 2	2
CAA1,3	8 ± 1	16 ± 2	7
CAA2,3	6 ± 0,8	65 ± 7	11
CAA1,2,3	20 ± 3	102 ± 10	5

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

Die Untersuchungen der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} zeigten einen Zusammenhang zwischen der GvpE-vermittelten Aktivierung und 5'-UTR_D. Die bioinformatische Analyse der 5'-UTR_D ergab drei putative Sekundärstrukturen S1, S2 und S3 mit UAS-ähnlichen Sequenzen. Generell zeigte sich jeweils ein Anstieg der basalen Expression beim Fehlen einer dieser Strukturen. Im Hinblick auf die GvpE-vermittelte Aktivierung erwies sich S1 als die Struktur mit dem größten Einfluss. Die höchste basale Expression von P_{pD} wie auch bei einer Induktion des Promotors durch cGvpE wurde jeweils bei der *leaderlosen* Translation von *mgfp6Δ* detektiert.

Zusammenfassend bestätigte die Validierung des mGFP6-Reportersystems mGFP6 als eine einfache, schnelle und empfindliche Alternative zur Untersuchung der haloarchaealen Genexpression auf Transkriptions- wie auch auf Translationsebene. So konnten mit Hilfe von mGFP6 verschiedene Promotoraktivitäten und auch die Rolle unterschiedlicher Regulatorelemente einfach und schnell detektiert werden. Der Austausch von *lacZ* im Originalplasmid pPLacZJB18 durch eine Promotorsequenz ermöglicht zudem die schnelle Blau-Weiß-Selektion in *E. coli*.

Von den sechs mittels mGFP6 charakterisierten Promotoren waren nur P_{fdx} und P_2 konstitutiv in der exponentiellen und der frühen stationären Wachstumsphase. Die Gasvesikelpromotoren P_{pO} , P_{pD} und P_{pF} besaßen dagegen ein deutlich niedrigeres, wachstumsphasenabhängiges Aktivitätsmuster und sind daher ungeeignet für ein induzierbares Genexpressionssystem. Eine Abwesenheit der 5'-UTR_A führte, ausgehend des P_{pA} -Promotors zu einer über der exponentiellen Wachstumsphase konstitutive Genexpression. Somit stellt P_{pA} , mit seinem Aktivator GvpE, den einzigen Promotor der p-vac-Region dar, der neben P_{fdx} und P_2 in einem induzierbaren Expressionssystem in Haloarchaea Anwendung finden könnte.

4.3. Aufbau eines induzierbaren Expressionssystems für Haloarchaea

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein induzierbares Expressionssystem für Haloarchaea konstruiert. In Eukaryoten und Bakterien finden induzierbare Expressionssysteme eine breite Anwendung und werden zur Analyse von Stoffwechselwegen oder zur Untersuchung der Regulation der Genexpression eingesetzt (Geraskina et al., 2019; Honjo et al., 2019; Martins-Santana et al., 2018). Der Vorteil eines induzierbaren Expressionssystems liegt in der Möglichkeit, die Genexpression zeitlich zu steuern. In Haloarchaea kann die Transkription von Genen unter Kontrolle des Tryptophan-induzierbaren *p.tnA*-Promotors oder des K⁺-abhängigen Promotors P_{kdp} reguliert werden (Allers et al., 2010; Kixmuller and Greie, 2012). Eine Metabolisierung dieser beiden Liganden und somit eine Veränderung der physiologischen Eigenschaften der Zelle kann nicht ausgeschlossen werden. Da zur Regulation der haloarchaealen Transkription kein weiteres induzierbares System zur Verfügung steht, wurden in dieser Arbeit die in Bakterien gut funktionierenden Theophyllin-abhängigen Riboswitche in Haloarchaea etabliert.

Zum Aufbau eines induzierbaren Expressionssystem für Haloarchaea wurde ein synthetisches System basierend auf einem Riboswitch gewählt. Die Regulation der Translationsinitiation in Prokaryonten

mittels Riboswitch erfolgt auf mRNA-Ebene meist durch die Maskierung der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz und/oder des AUG-Startcodons bei An- oder Abwesenheit des Liganden. Da für die haloarchaeale Translation eine SD-Sequenz nicht zwingend nötig ist, wurden sechs synthetische, Theophyllin-abhängige Riboswitche (A bis E, E*) getestet, die neben der SD-Sequenz auch das AUG-Startcodon des stromabwärts gelegenen Leserahmens auf der mRNA maskieren (Desai and Gallivan, 2004). In Gegenwart von Theophyllin erfolgt eine Umstrukturierung des Riboswitches, sodass die SD-Sequenz sowie das AUG-Startcodon freigegeben werden und die Translation ablaufen kann (sogenannter ON-Switch).

4.3.1. Einfluss von Theophyllin auf das Wachstum und die Expression von *Hfx. volcanii*

Aufgrund seiner geringen toxischen Eigenschaft stellt Theophyllin einen der am häufigsten verwendeten Liganden dar. In *Streptomyces coelicolor* wurde ab einer Theophyllin-Konzentration ≥ 4 mM ein verlangsamtes Wachstum festgestellt (Rudolph, 2016). Um den Effekt von Theophyllin auf das Wachstum von *Hfx. volcanii* zu untersuchen, wurden Wachstumskurven mit unterschiedlichen Theophyllin-Konzentrationen (0, 1, 2, 3, 4, 5 und 10 mM) aufgenommen. Als Medium wurde 3 M Vollmedium mit 3 M NaCl gewählt. Die Inkubationstemperatur betrug 42 °C (Abbildung 38). Bei einer Konzentration von 10 mM Theophyllin zeigte *Hfx. volcanii* WR340 ein verlangsamtes Wachstum.

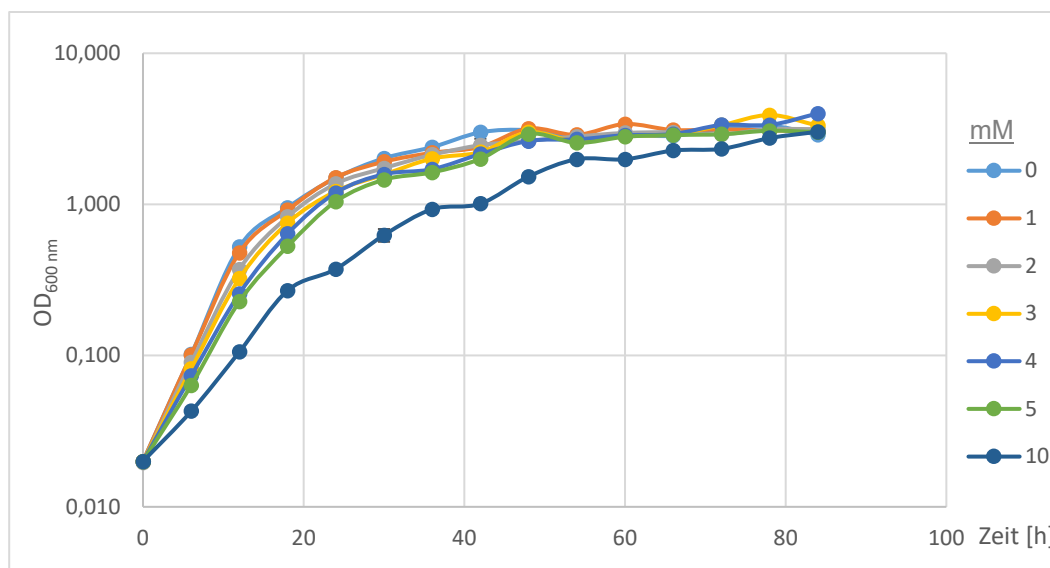


Abbildung 38: Einfluss verschiedener Theophyllin-Konzentrationen auf das Wachstum von *Hfx. volcanii*. Die Kulturen wurden für 84 h bei verschiedenen Theophyllin-Konzentrationen inkubiert und deren optische Dichte zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Die Werte wurden halblogarithmisch aufgetragen. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Theophyllin auf die Genexpression in *Hfx. volcanii* wurde das Plasmid pLacZJB19 auf Basis von pLacZJB18 mittels Gibson Assembly generiert. Im Gegensatz zu

pLacZJB18 verfügt pLacZJB19 anstelle von *mgfp6* über das *bgaH*-Gen als Reporter (**Abbildung 39**). Um die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI*, die sich im *bgaH*-Leserahmen befinden, in Zukunft nutzen zu können, wurden deren Erkennungssequenzen durch stille Mutationen entfernt. Zur Bestimmung der Miller Units (MU) wurde das Enzym BgaH als Reporter gewählt.

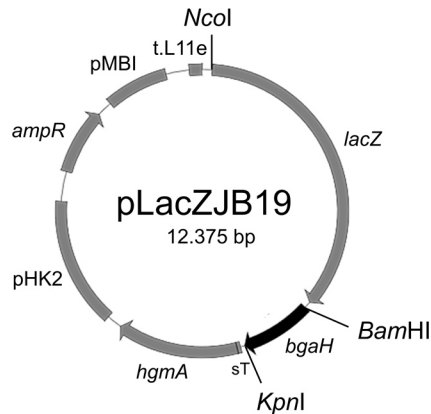


Abbildung 39: Haloarchaea/*E. coli* shuttle Vector pLacZJB19. pLacZJB19 enthält *lacZ* stromauf vom *bgaH*-Gen. Das *P_{lac}-lacZ-bgaH*-Fragment wird von einem haloarchaealen Terminator (t.L11e) und einem synthetischen Terminator flankiert. Für Promotorstudien wird *P_{lac}-lacZ* durch eine Regulatorsequenz mit *NcoI* und *BamHI* ersetzt, während das Reportergen via *BamHI* und *KpnI* ausgetauscht werden kann.

Zur Expression des *bgaH*-Gens wurde das *lacZ*-Gen in pLacZJB19 via *NcoI* und *BamHI* mit der Promotorsequenz von *P_{fdx}* ausgetauscht. Die Promotorsequenz enthielt neben dem Transkriptionsstart des *Ferredoxin*-Gens die Erkennungssequenz von *EcoRI*. Somit befinden sich im resultierenden Plasmid pFDXJB19 zwischen dem Transkriptionsstart des *Ferredoxin*-Gens und dem *bgaH*-Leserahmen die Erkennungssequenzen von *EcoRI* und *BamHI*. Die resultierenden Transformanten wurden ohne oder mit 2 mM Theophyllin in 3 M Vollmedium auf eine OD₆₀₀ von 1,2 angezogen (180 rpm, 36 h, 42 °C) und anschließend die BgaH-Aktivität über die Miller Units bestimmt. Als Kontrolle diente *Hfx. volcanii* WR340 Wildtyp (**Abbildung 40**).

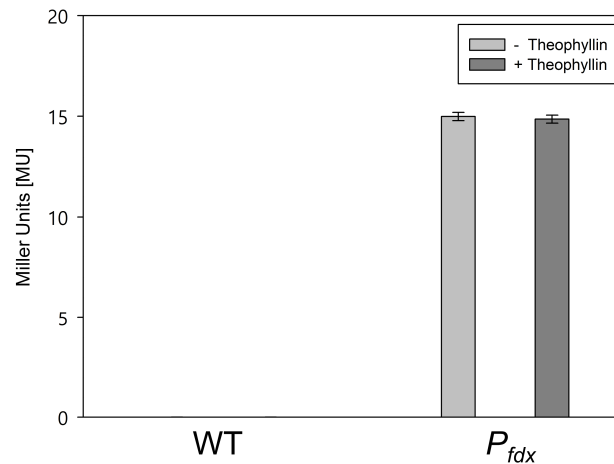


Abbildung 40: Einfluss von Theophyllin auf die *bgaH*-Expression *in vivo*. Die untersuchten Transformanten enthielten den *bgaH*-Leserahmen unter Kontrolle des P_{fdx} -Promoters. Die BgaH-Aktivität der Transformanten wurde nach 36 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 1,2) bestimmt und in Miller-Units angegeben. Die Zellen wurden in 3 M Vollmedium bei 42 °C angezogen. Als Negativkontrolle dienten Wildtyp-Zellen. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Theophyllin zeigte keine Auswirkungen auf die *bgaH*-Expression. So wurden bei Transformanten mit und ohne Theophyllin-Supplementierung fast identische BgaH-Aktivitäten gemessen. Die als Kontrolle verwendeten *Hfx. volcanii* Wildtyp-Zellen besaßen dagegen keine BgaH-Aktivität (**Abbildung 40**).

4.3.2. Theophyllin-abhängige Riboswitche A bis E und E* in *Hfx. volcanii*

Zur Regulation der haloarchaealen Translation wurde aufgrund der Maskierung des AUG-Starts die von Justin P. Gallivan entwickelten Theophyllin-abhängigen Riboswitche A bis E* gewählt (Desai and Gallivan, 2004). Dazu wurde das AUG-Startcodon des *bgaH*-Leserahmens in pFDXJB19 mittels Mutagenese-PCR deletiert und so pFDXJB19 Δ generiert. In pFDXJB19 wurde *via* *EcoRI* und *BamHI* zwischen P_{fdx} und dem *bgaH*-Gen eine konstante Region und die Sequenz einer der sechs Riboswitche inklusive ATG-Start inseriert. Die resultierten Plasmide enthielten somit *bgaH* unter Kontrolle des P_{fdx} -Promotors sowie einer der sechs Theophyllin-abhängigen Riboswitche. Zwischen AUG-Startcodon und *bgaH* Δ befand sich die Erkennungssequenz von *BamHI*. Als Positivkontrolle diente ein Plasmid, das anstelle des Theophyllin-abhängigen Aptamers, die nicht strukturbildenden CAA-Repeats (Hanson et al., 2003) und die Expressionsplattform von Riboswitch E enthielt (hier bezeichnet als K-Sequenz) (**Abbildung 41**). Das Plasmid pFDXJB19 diente als zweite Positivkontrolle.



Abbildung 41: Konstrukte zur Untersuchung der Theophyllin-abhängigen Translation in *Hfx. volcanii*. **A:** Schematische Darstellung der P_{fdx} -Riboswitch-*bgaH*-Fragmente. Zur Untersuchung der verschiedenen Riboswitche befindet sich zwischen P_{fdx} und dem *bgaH*-Leserahmen eine konstante Region sowie die Sequenz eines der jeweiligen Riboswitche. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. **B:** DNA-Sequenzen des jeweiligen Fusionsbereiches. Die Promotorsequenz von P_{fdx} ist fett geschrieben und die konstante Region unterstrichen. Die verschiedenen Riboswitche sind in Grau hinterlegt und die Sequenz des Theophyllin-Aptamer zusätzlich unterstrichen. Der ATG-Start ist doppelt unterstrichen und die Erkennungssequenz von *EcoRI* und *BamHI* kursiv. Der Transkriptionsstart (TG) ist gestrichelt unterstrichen. Die CAA-Repeats der K-Sequenz des Plasmids pCAAJB19Δ sind in kleinen Buchstaben angegeben. Die ersten drei Nukleotide des offenen Leserahmens des *bgaH*-Leserahmens sowie dessen Stopcodon ist in Blau hervorgehoben.

Die resultierenden Transformanten wurden mit und ohne 2 mM Theophyllin (in Medium mit 3 M NaCl) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,2 (36 h) angezogen und anschließend die BgaH-Aktivität bestimmt. Inkubiert wurde bei 37 °C, da die Theophyllin-abhängigen Riboswitche bislang zwischen 28 und 37 °C erfolgreich angewandt wurden (Rudolph et al., 2013; Topp et al., 2011).

Die Insertion der K-Sequenz zwischen Transkriptions- und ATG-Start führte zu einer 70%igen Verringerung der *bgaH*-Expression ausgehend des P_{fdx} -Promotors (CAA-Transformanten) im Vergleich zur *leaderlosen* Translation der Reportergen-mRNA (**Abbildung 42**). In Gegenwart von Theophyllin wurden keine signifikanten Unterschiede der BgaH-Aktivität erhalten. Noch geringere Werte wurden bei Anwesenheit der sechs Riboswitche detektiert. Von allen getesteten Riboswitche zeigte nur Riboswitch E

ein Schaltverhalten. Hier wurde eine 3-fache Aktivierung der basalen *bgaH*-Expression in Gegenwart von Theophyllin detektiert. Die Riboswitche A, B, C, D und E* zeigten dagegen keine Aktivierbarkeit durch Theophyllin in *Hfx. volcanii*. Die höchste *bgaH*-Expression in Gegenwart eines Riboswitches wurde bei C gemessen, während die Insertion von Riboswitch A zu der geringsten Expressionsstärke führte. Eine komplette Repression der basalen *bgaH*-Translation wurde in keinem Fall beobachtet (**Abbildung 42, Tabelle 21**).

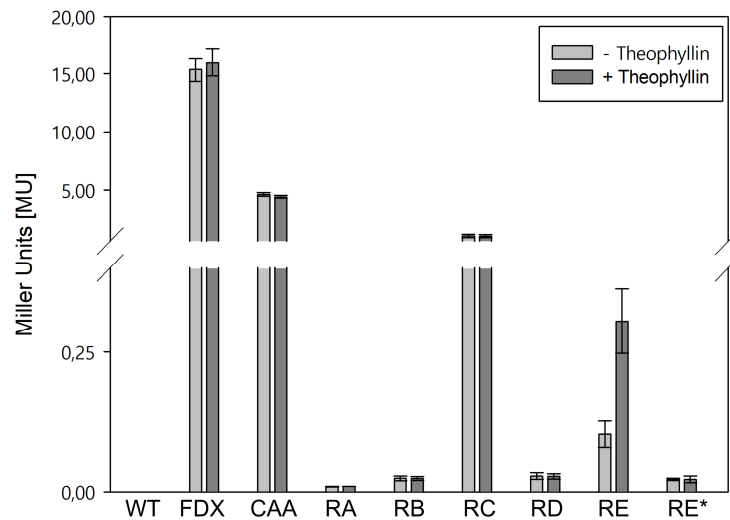


Abbildung 42: Schaltverhalten der Theophyllin-abhängigen Riboswitche A, B, C, D, E und E* in *Hfx. volcanii*.

Zur Untersuchung einer induzierbaren Translationsinitiation in *Hfx. volcanii* wurde die *bgaH*-Expression jeweils unter Kontrolle eines der sechs Theophyllin-abhängigen Riboswitche gesetzt und die BgaH-Aktivität in An- und Abwesenheit von Theophyllin bestimmt. Die BgaH-Aktivität der verschiedenen Transformanten sowie der Wildtyp-Zellen wurde nach 36 h Inkubationszeit (OD₆₀₀ von 1,2) bestimmt und in Miller-Units angegeben. WT: Wildtyp Zellen, FDX: *bgaH*-Expression unter Kontrolle von *P_{fdx}*, CAA: Transformanten mit CAA-Repeats anstelle des Theophyllin-Aptamers, RA: Transformanten mit Riboswitch A, RB: Transformanten mit Riboswitch B, RC: Transformanten mit Riboswitch C, RD: Transformanten mit Riboswitch D, RE: Transformanten mit Riboswitch E, RE*: Transformanten mit Riboswitch E*. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 21: Schaltverhalten der Riboswitche A, B, C, D, E und E* in *Hfx. volcanii*.

Transformanten	Basale Aktivität	+ Theophyllin	Faktor der Aktivierung
Miller-Units [MU]			
WT	0	0	/
FDX	15,40 ± 1,02	16,00 ± 1,20	1
CAA	4,62 ± 0,16	4,40 ± 0,14	1
RA	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1
RB	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	1
RC	0,95 ± 0,03	0,93 ± 0,05	1
RD	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	1
RE	0,10 ± 0,02	0,31 ± 0,06	3
RE*	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	1

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

Um die regulatorische Wirkung von Riboswitch E auf verschiedenen Expressionsniveaus zu vergleichen, wurde P_{fdx} durch die Promotoren P_2 , P_{pA} bzw. P_{pD} in pREJB19 Δ ausgetauscht und die *bgaH*-Expression analysiert. Die Quantifizierung der BgaH-Aktivität der jeweiligen Transformanten ergab bei keiner Variante in An- oder Abwesenheit von Theophyllin detektierbare Messungen. Daher wurden die Promotoren P_2 , P_{pA} und P_{pD} in Kombination mit Riboswitch E nicht verwendet, um die Genexpression in *Hfx. volcanii* zu regulieren.

Um die Schaltfähigkeit von Riboswitch E in *Hfx. volcanii* zu verbessern, wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die von Riboswitch E kontrollierte *bgaH*-Expression untersucht. Es wurde das Schaltverhalten bei unterschiedlichen Theophyllin-Konzentrationen, die Kinetik der Induktion und Repression der BgaH-Aktivität sowie die Schaltfähigkeit von Riboswitch E bei verschiedenen Salzgehalten und Temperaturen bestimmt.

4.3.3. Untersuchung der dosisabhängigen Aktivierung von Riboswitch E in *Hfx. volcanii*

Zur Analyse der dosisabhängigen Regulation der *bgaH*-Expression durch Riboswitch E wurden die RE-Transformanten in Gegenwart unterschiedlicher Theophyllin-Konzentrationen (0, 1, 2, 3, 4 oder 5 mM) bei 37 °C und 3 M NaCl bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,2 angezogen und die BgaH-Aktivität bestimmt. Als Negativkontrolle diente Medium mit 5 M Koffein. Die *bgaH*-Expression stieg bei einer Erhöhung der Theophyllin-Konzentration bis 2 mM an. Ab einer Konzentration von 3 mM Theophyllin wurde eine nahezu gleichbleibende BgaH-Aktivität detektiert. Die Supplementierung von Koffein führte zu keiner Aktivierung von Riboswitch E (**Abbildung 43, Tabelle 22**). Alle weiteren Experimente wurden mit einer Theophyllin-Konzentration von 2 mM durchgeführt.

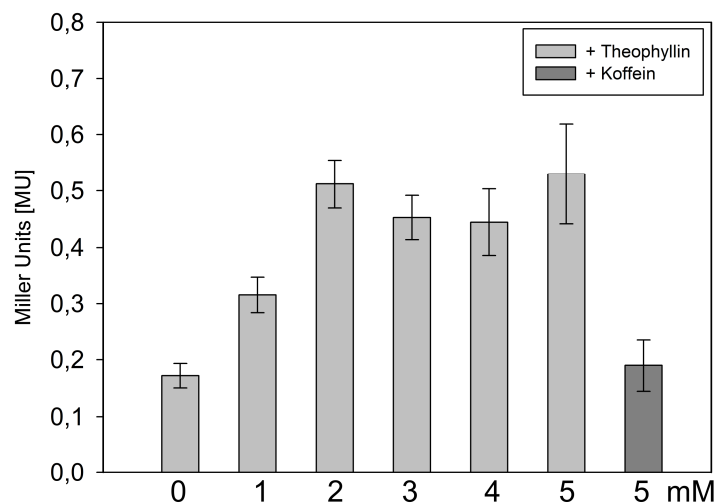


Abbildung 43: Einfluss verschiedener Theophyllin-Konzentrationen auf die von Riboswitch E kontrollierte BgaH-Aktivität. Die RE-Transformanten wurden in Gegenwart von 0, 1, 2, 3, 4 oder 5 mM Theophyllin bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 angezogen (Salzkonzentration: 3 M NaCl, Inkubationstemperatur: 37 °C) und die BgaH-Aktivität in Miller Units angegeben. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 22: Einfluss verschiedener Theophyllin-Konzentrationen auf die von Riboswitch E kontrollierte BgaH-Aktivität.

mM Theophyllin	Miller Units [MU]*
0	0,17 ± 0,02
1	0,32 ± 0,03
2	0,51 ± 0,04
3	0,45 ± 0,04
4	0,44 ± 0,06
5	0,53 ± 0,09
5 mM Koffein	0,19 ± 0,05

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

4.3.4. Kinetik nach Induktion der basalen *bgaH*-Expression durch Theophyllin

Um zu überprüfen, ob und wann eine Aktivierung der von Riboswitch E kontrollierten *bgaH*-Expression nach Zugabe von Theophyllin erfolgt, wurden RE-Transformanten für 8 Stunden in 3 M Vollmedium und bei 37 °C ohne Theophyllin inkubiert. Anschließend wurden 2 mM Theophyllin (Zeitpunkt 0) hinzugegeben und die BgaH-Aktivität nach 2, 4, 6, 8 und 10 Stunden quantifiziert. Eine leichte Erhöhung der *bgaH*-Expression konnte bereits ab 4 Stunden nach Supplementierung von Theophyllin beobachtet werden. Das Maximum wurde nach 6 Stunden erreicht (**Abbildung 44**).

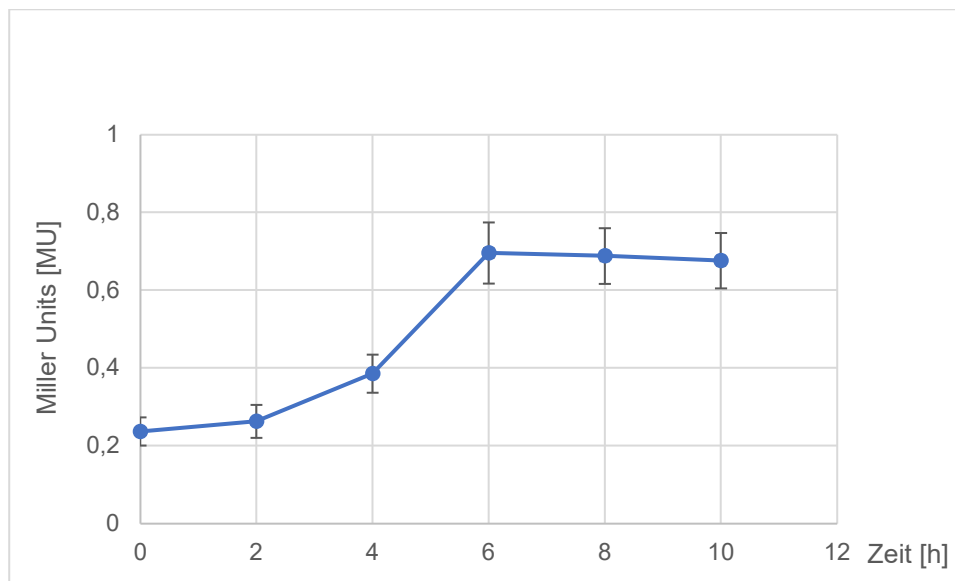


Abbildung 44: Kinetik nach Induktion der basalen *bgaH*-Expression nach Zugabe von Theophyllin. Die Supplementierung von 2 mM Theophyllin erfolgte nach einer 8-stündigen Inkubation der Transformanten (Salzkonzentration: 3 M NaCl, Inkubationstemperatur: 37 °C). Die BgaH-Aktivität wurde nach 2, 4, 6, 8 und 10 Stunden quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

4.3.5. Kinetik der Repression der *bgaH*-Expression nach Entfernung von Theophyllin

Um zu überprüfen, ob und wann die *bgaH*-Expression durch Entfernen von Theophyllin reversibel reprimiert werden kann, wurden RE-Transformanten in 3 M Vollmedium supplementiert mit 2 mM Theophyllin für 8 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (Zeitpunkt 0). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in Salzwasser gewaschen und in Medium (3 M NaCl) ohne Theophyllin für 36 h bei 37 °C weiter inkubiert. Die BgaH-Aktivität wurde nach 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30 und 36 h quantifiziert. Eine leichte Repression der *bgaH*-Expression wurde bereits nach 4 h beobachtet. Nach 36 h nach Auswaschung von Theophyllin wurde eine BgaH-Aktivität vergleichbar mit nicht induzierten Kulturen detektiert (**Abbildung 45**).

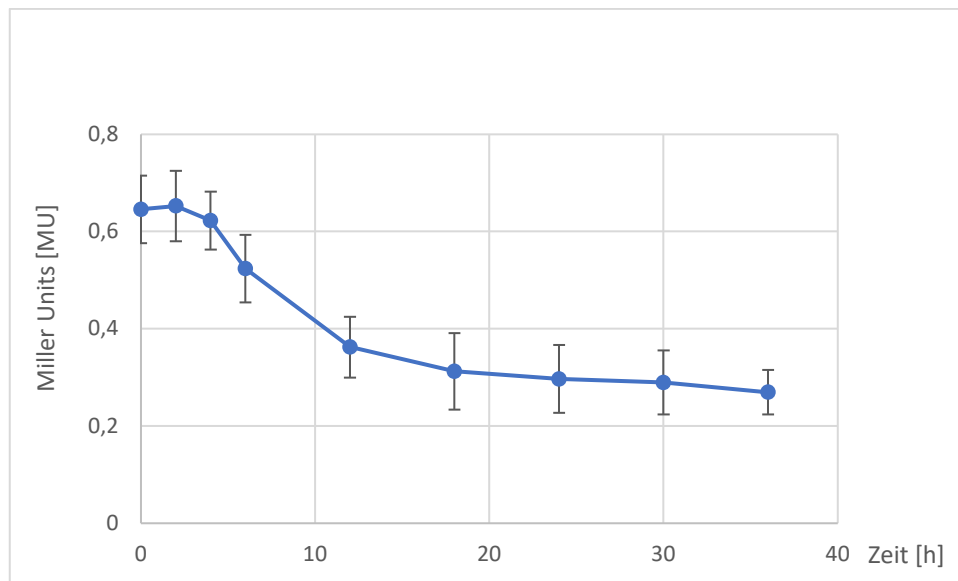


Abbildung 45: Repression der *bgaH*-Expression durch Auswaschung von Theophyllin. RE-Transformanten wurden für 8 h bei 37 °C in 3 M Vollmedium mit 2 mM Theophyllin inkubiert. Die Inkubation der Zellen wurde für 36 h in Medium ohne Theophyllin fortgesetzt und die BgaH-Aktivität nach 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30 und 36 h quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

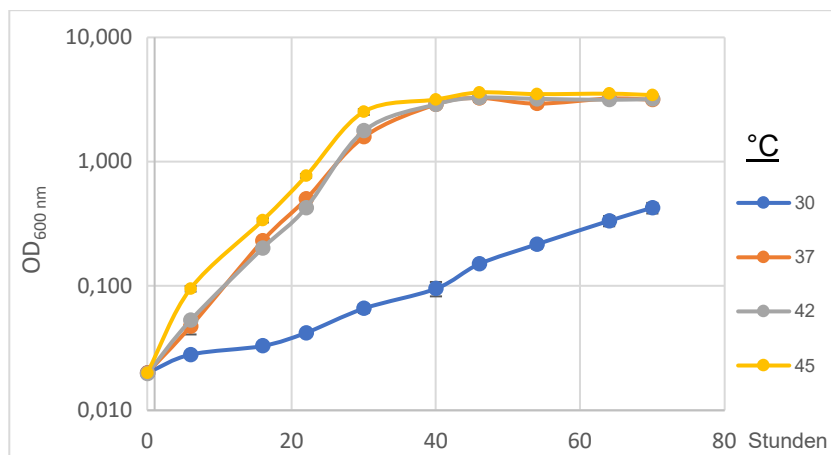
4.3.6. Einfluss der Inkubationstemperatur auf Riboswitch E in *Hfx. volcanii*

Zur Anwendung eines haloarchaealen, induzierbaren Expressionssystems spielen neben funktionsfähigen Regulatoren auch die Wachstumsrate sowie die Physiologie der Zelle eine wichtige Rolle. Da die Schaltfähigkeit des Riboswitches E durch Veränderung der Inkubationstemperatur verbessert werden sollte, wurde im Vorfeld die Auswirkung der Temperatur auf das Wachstum sowie die Expression von *Hfx. volcanii* WR340 untersucht. Dazu wurden Wachstumskurven mit Wildtyp-Zellen bei 30, 37, 42 und 45 °C angefertigt und miteinander verglichen (**Abbildung 46 A**). Als Medium wurde Vollmedium mit 3 M NaCl gewählt. Die optimale Wachstumstemperatur lag bei 45 °C, gefolgt von 37, 42 und 30 °C. Ein signifikanter Unterschied zwischen 37 und 42 °C wurde nicht festgestellt. Bei einer

Inkubationstemperatur von 30 °C wiesen die Zellen ein deutlich langsames Wachstum auf und erreichten im Gegensatz zu den anderen Kulturen die stationäre Phase nicht.

Zur Analyse der *bgaH*-Expression unter Kontrolle von P_{fdx} in Bezug auf die Temperatur wurden Transformanten mit pFDXJB19 für 45 h bei 30, 37, 42 oder 45 °C inkubiert und anschließend die BgaH-Aktivität über die Miller Units bestimmt (**Abbildung 46 B**). Aufgrund des Temperaturoptimums von *Hfx. volcanii* wurde die gemessene BgaH-Aktivität bei 45 °C (11,8 Miller Units) als Referenz gewählt. Einen Einfluss der niedrigeren Temperaturen auf die Expression wurde nur bei 30 °C (9,4 Miller Units) beobachtet. Mit jeweils 11,7 Miller Units führte eine Inkubation bei 37 und 42 °C zu einer fast identischen *bgaH*-Expression wie bei 45 °C.

A



B

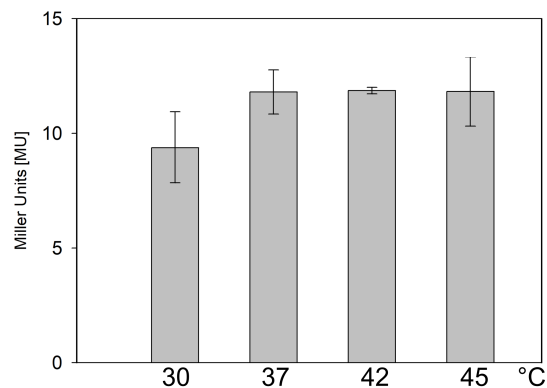


Abbildung 46: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum und auf die *bgaH*-Expression in *Hfx. volcanii*. **A:** Einfluss der Inkubationstemperatur auf das Wachstum von *Hfx. volcanii*. Die Kulturen wurden für 54 h bei 30, 37, 42 oder 45 °C und 3 M NaCl inkubiert und deren optische Dichte zu unterschiedlichen Inkubationszeiten gemessen. Die Werte wurden halblogarithmisch aufgetragen. **B:** Einfluss der Temperatur auf die Expression von *Hfx. volcanii*. Die FDX-*bgaH*-Transformanten wurden bei 30, 37, 42 oder 45 °C und 3 M NaCl angezogen und nach 45 h die BgaH-Aktivität in Miller Units bestimmt. Beide Experimente wurden in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Um die Aktivierbarkeit des Riboswitches E in *Hfx. volcanii* bei unterschiedlichen Anzuchtstemperaturen zu bestimmen, wurden die RE-Transformanten bei 30, 37, 42 und 45 °C in 3 M Vollmedium mit und ohne 2 mM Theophyllin für 45 h (OD₆₀₀ von 1,2) angezogen. (Abbildung 47, Tabelle 23).

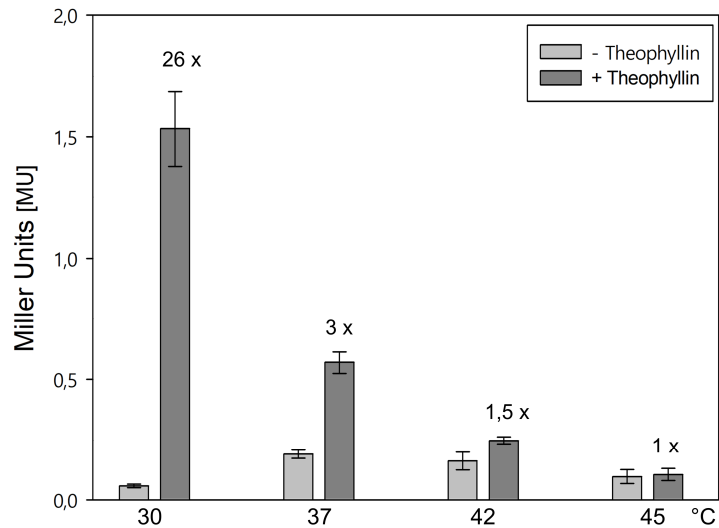


Abbildung 47: Einfluss der Temperatur auf die Aktivierung des Theophyllin-abhängigen Riboswitches E in *Hfx. volcanii*. Die RE-Transformanten wurden für 48 h bei 30, 37, 42 oder 45 °C sowie einer NaCl-Konzentration von 3 M in An- und Abwesenheit von Theophyllin (2 mM) inkubiert und anschließend die BgaH-Aktivität in Miller Units bestimmt. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 23: Einfluss der Temperatur auf die Aktivierung des theophyllin-abhängigen Riboswitches E in *Hfx. volcanii*.

Temperatur [°C]	Basale Aktivität	+ Theophyllin	Faktor der Aktivierung
Miller-Units [MU] x 10 ³ *			
30	0,06 ± 0,00	1,53 ± 0,15	26
37	0,19 ± 0,02	0,57 ± 0,05	3
42	0,16 ± 0,04	0,25 ± 0,01	1,5
45	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,03	1

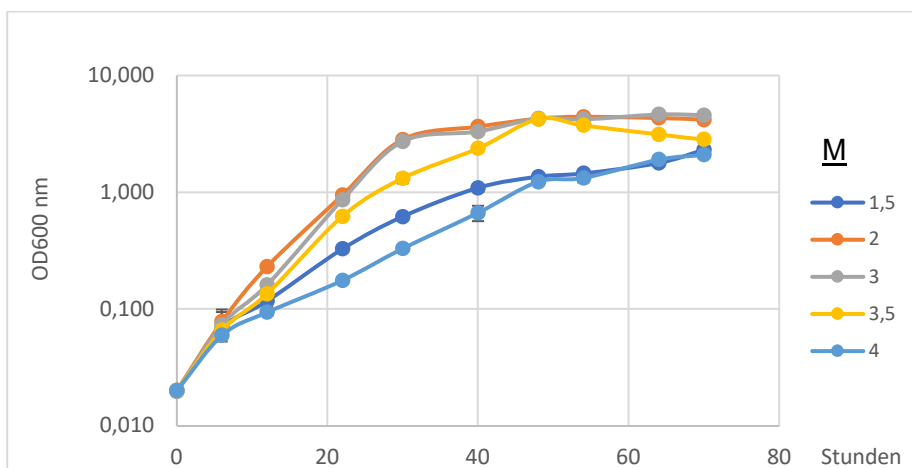
* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

Die Quantifizierung der BgaH-Aktivität der Transformanten zeigte in jedem Fall eine schwächer werdende Aktivierbarkeit des Riboswitches E in *Hfx. volcanii* mit steigender Anzuchttemperatur. So wurde in Anwesenheit von Theophyllin der höchste Aktivierungsfaktor von 26-fach bei einer Temperatur von 30 °C gemessen, während bei einer Anzuchttemperatur von 37 °C die Schaltbarkeit von Riboswitch E auf einen Faktor von 3 sank. Bei einer Inkubation bei 42 °C wurde ein 1,5-facher Aktivierungsfaktor gemessen. Bei 45 °C zeigte sich keine Schaltfähigkeit des Riboswitches E *in vivo* mehr (Abbildung 47, Tabelle 23).

4.3.7. Einfluss der intrazellulären Salzkonzentration auf Riboswitch E in *Hfx. volcanii*

Zur Analyse einer möglichen Verbesserung der Aktiverbarkeit von Riboswitch E in *Hfx. volcanii* durch eine veränderte intrazelluläre Salzkonzentration wurden im Vorfeld die Auswirkungen einer Salzkonzentration von 1,5; 2; 3; 3,5; und 4 M NaCl im Anzuchtmedium auf das Wachstum und die Expression in *Hfx. volcanii* untersucht (Abbildung 48 A und B). Als Inkubationstemperatur wurden 37 °C gewählt.

A



B

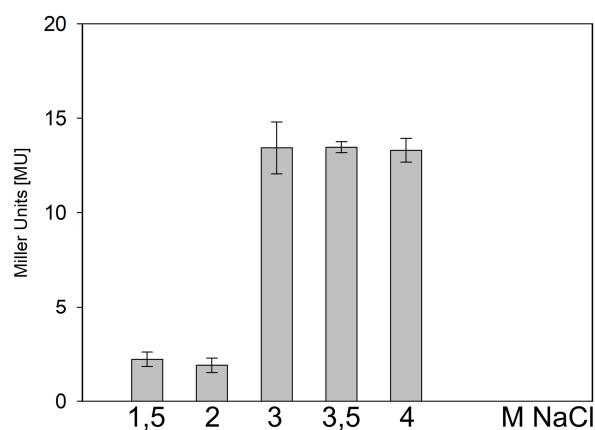


Abbildung 48: Einfluss der Salzkonzentration auf das Wachstum und auf die Expression in *Hfx. volcanii*. **A:** Einfluss der Salzkonzentration auf das Wachstum von *Hfx. volcanii*. Die Kulturen wurden für 70 h bei 1,5; 2; 3; 3,5 oder 4 M NaCl und 37 °C inkubiert und deren optische Dichte zu unterschiedlichen Inkubationszeiten gemessen. Die Werte wurden logarithmisch aufgetragen. **B:** Einfluss der Salzkonzentration auf die Expression in *Hfx. volcanii*. Die *P_{dx}-bgaH*-Transformanten wurden bei 1,5; 2; 3; 3,5 oder 4 M NaCl und 37 °C inkubiert und nach 37 h die BgaH-Aktivität über die Miller Units bestimmt. Beide Experimente wurden in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Die besten Wachstumsbedingungen wurden bei einer Salzkonzentration von 2 bzw. 3 M NaCl im Medium beobachtet. Bei einer Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 3,5 M wiesen die Zellen ein schlechteres und bei 1,5 M und 4 M NaCl ein deutlich schlechteres Wachstum auf (**Abbildung 48 A**).

Zur Analyse des Einflusses des Salzgehaltes auf die *bgaH*-Expression unter Kontrolle von P_{fdx} wurden die RE-Transformanten in Medium mit 1,5; 2; 3; 3,5 oder 4 M für 37 h angezogen. Als Inkubationstemperatur wurde aufgrund des besseren Wachstums der Zellen 37 °C anstelle von 30 °C gewählt. Die Quantifizierung der BgaH-Aktivität zeigte mit 2,2 bzw. 1,9 Miller Units bei einer Salzkonzentration von 1,5 M bzw. 2 M eine um circa 6,5-fach geringere *bgaH*-Expression als bei 3 M; 3,5 M und 4 M NaCl. Signifikante Unterschiede zwischen 3; 3,5 und 4 M NaCl wurden nicht festgestellt (**Abbildung 48 B**).

Um die Abhängigkeit der Aktivierung von Riboswitch E von der intrazellulären Salzkonzentration in *Hfx. volcanii* zu untersuchen, wurden RE-Transformanten in Medium mit 1,5 M, 2 M, 3 M, 3,5 M oder 4 M NaCl in An- und Abwesenheit von Theophyllin (2 mM) für 37 h angezogen (**Abbildung 49, Tabelle 24**). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C.

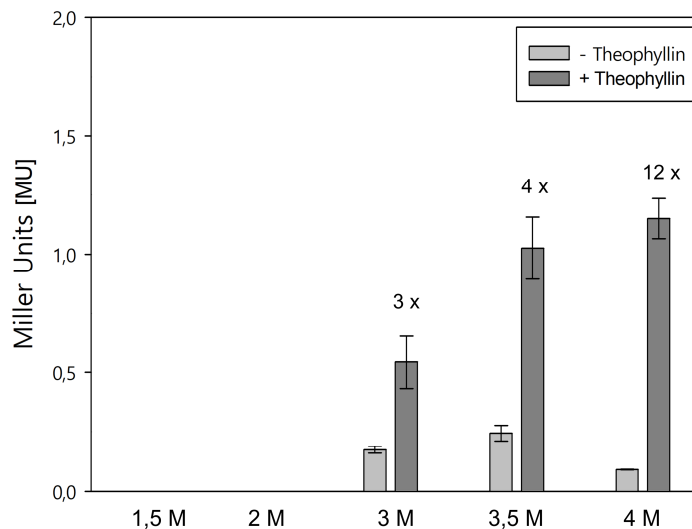


Abbildung 49: Einfluss der Salzkonzentration auf die Aktivierung des Theophyllin-abhängigen Riboswitches E in *Hfx. volcanii*. Die RE-Transformanten wurden für 37 h in Medium mit 1,5 M, 2 M, 3 M, 3,5 M oder 4 M in An- und Abwesenheit von Theophyllin bei 37 °C inkubiert und anschließend die BgaH-Aktivität in Miller Units bestimmt. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Tabelle 24: Einfluss verschiedener NaCl-Konzentrationen auf die Aktivierung des Theophyllin-abhängigen Riboswitches E in *Hfx. volcanii*.

NaCl-Konzentration [M]	Basale Aktivität	+ Theophyllin	Faktor der Aktivierung
Miller Units [MU]			
1,5	0	0	/
2	0	0	/
3	0,17 ± 0,01	0,54 ± 0,11	3
3,5	0,24 ± 0,03	1,03 ± 0,13	4
4	0,09 ± 0,0	1,15 ± 0,09	12

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

Mit steigender NaCl-Konzentration wurde eine Zunahme der Aktivierbarkeit des Riboswitches E festgestellt. Bei einer Salzkonzentration von 3 M wurde durch die Supplementierung von Theophyllin eine 3-fach höhere BgaH-Aktivität gemessen, während bei 3,5 M NaCl und bei 4 M NaCl in Anwesenheit des Induktors eine 4-fache bzw. eine 12-fache Aktivierbarkeit des Riboswitches E detektiert wurde. Bei den Medien mit 1,5 M bzw. 2 M NaCl war dagegen keine BgaH-Aktivität messbar. Im Hinblick auf die Aktivierbarkeit des Riboswitches E wurden daher eine Anzuchttemperatur bei 30 °C und eine NaCl-Konzentration des Mediums von 4 M als beste Bedingungen identifiziert.

4.3.8. Aktivierung von Riboswitch E in *Hfx. volcanii* bei 30 °C und 4 M NaCl

Die Anzucht der RE-Transformanten bei 30 °C und 4 M NaCl erfolgte in An- bzw. Abwesenheit von Theophyllin bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,2 für 6 Tage. Die Quantifizierung der BgaH-Aktivität zeigte eine basale Expression von $0,29 \pm 0,01$ MU. In Anwesenheit von Theophyllin wurden $3,90 \pm 0,48$ MU detektiert, was einer 13-fachen Aktivierung entspricht (**Abbildung 50**). Eine Schaltfähigkeit von 26-fach, wie bei einer Anzucht bei 30 °C und 3 M NaCl wurde nicht erreicht.

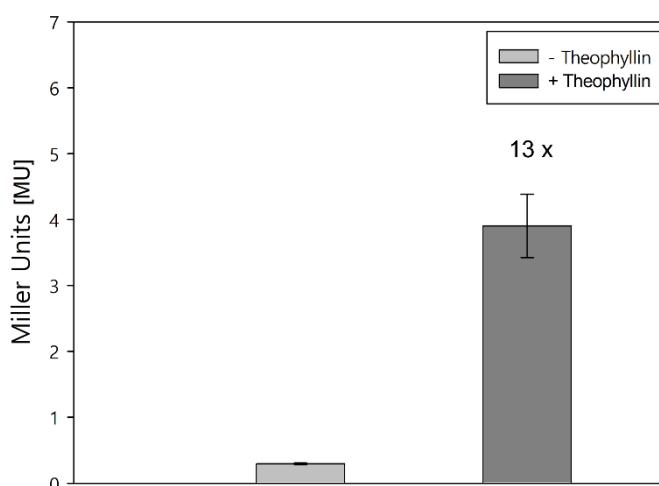


Abbildung 50: Aktivierbarkeit des Theophyllin-abhängigen Riboswitch E in *Hfx. volcanii* bei 30 °C und 4 M NaCl. Die RE-Transformanten wurden in Medium mit 4 M NaCl in An- und Abwesenheit von Theophyllin (2mM) für 6 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend die BgaH-Aktivität in Miller Units bestimmt. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

Zusammenfassend zeigte sich eine steigende Aktivierbarkeit bei sinkender Temperatur und zunehmender NaCl-Konzentration im Medium. Die optimalen Bedingungen zur Anwendung des Riboswitches E liegt bei einer Anzuchttemperatur von 30 °C und 4 M NaCl. Wegen des sehr langsamen Wachstums von *Hfx. volcanii* unter diesen Bedingungen ist aber eine Anzuchttemperatur von 37 °C und 3 M NaCl zu bevorzugen.

4.3.9. Mutation von Riboswitch E und E*

Die vorhergehenden Ergebnisse ließen generell eine hohe Stabilität der getesteten Riboswitches im hypersalinen Milieu vermuten. Daher wurden von Max Dombrowsky von der Arbeitsgruppe Hamacher an der TU-Darmstadt *in silico*-Modellierungen basierend auf Riboswitch E und E* durchgeführt, die zu weniger stabilen und so in Haloarchaea potentiell besser schaltfähigen Varianten führen sollten. Die Substitutionen erfolgten im Bereich des Stammes und der einzelsträngigen Bereiche des Theophyllin-abhängigen Aptamers (Abbildung 51).

A

Theophyllin-abhängiges Aptamer	
GGT <u>GAT</u> ACCAGCATC <u>GTCTT</u> GATGCC <u>CTT</u> GGCAGCACCCCTGCTAAGGAGGTAACAACAAG	E
GG <u>A</u> GATACCAGCATC <u>AGTTT</u> GATGCC <u>CTT</u> GGCAGCTCCCTGCTAAGGAGGTAACAACAAG	E 1
CGT <u>GAT</u> ACCAGCATC <u>ATCTT</u> GATGCC <u>CTT</u> GGCAGCACGCTGCTAAGGAGGTAACAACAAG	E 2
CGT <u>GAT</u> ACCAGCATC <u>ATCTG</u> GATGCC <u>CTT</u> GGCAGCACGCTGCTAAGGAGGTAACAACAAG	E 3
Theophyllin-abhängiges Aptamer	
GGT <u>GAT</u> ACCAGCATC <u>GTCTT</u> GATGCC <u>CTT</u> GGCAGCACCCCTGCTAAGGAGGCAACAAG	E*
GG <u>A</u> GATACCAGCATC <u>AGTTT</u> GATGCC <u>CTT</u> GGCAGCTCCCTGCTAAGGAGGCAACAAG	E* 1
CGT <u>GAT</u> ACCAGCATC <u>ATCTT</u> GATGCC <u>CTT</u> GGCAGCACGCTGCTAAGGAGGCAACAAG	E* 2
CGT <u>GAT</u> ACCAGCATC <u>ATCTG</u> GATGCC <u>CTT</u> GGCAGCACGCTGCTAAGGAGGCAACAAG	E* 3

B

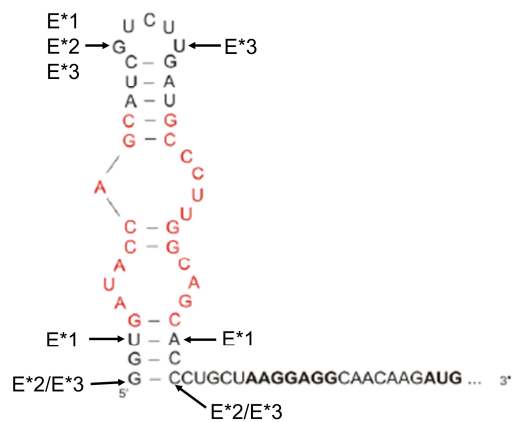


Abbildung 51: Varianten der Theophyllin-abhängigen Riboswitches E und E*. A: Sequenzen der Riboswitches E und E* sowie deren Varianten. Mittels *in silico*-Modellierung wurden potentiell im Hochsalz besser regulierbare Theophyllin-Riboswitch-Varianten vorhergesagt. Die bioinformatische Berechnung erfolgte von Maximilian Dombrowsky in der AG Hamacher an der TU Darmstadt. E: Theophyllin-abhängiger Riboswitch E. E*: Theophyllin-abhängiger Riboswitch E*. Rot: substituierte Nukleotide. Unterstrichen: einzelsträngiger Bereich. Grau hinterlegt: doppelsträngiger Bereich. Kursiv: SD-Sequenz. B: Positionen der Substitutionen der offenen Konformation am Beispiel der Riboswitch E*-Struktur. Rot: Theophyllin-Bindestelle. Fett: SD-Sequenz und AUG-Startcodon.

Zur Überprüfung der Riboswitch E und E* Varianten wurden diese mit dem originalen Riboswitch E in pREJB19 Δ ausgetauscht und deren Schaltverhalten mittels BgaH untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Transformanten auf 3 M Festmedium (+ 20 μ g/ml X-Gal) mit und ohne 2 mM Theophyllin ausplattiert und bei 25 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten RE- bzw. RE*- sowie CAA-Transformanten. Letztere verfügten anstelle des Theophyllin-abhängigen Aptamers über CAA-*Repeats*.

Nach 4 Wochen zeigten die Riboswitch E*-Varianten E*1, E*2 und E*3 eine blaue Färbung, während Transformanten mit einer *bgaH*-Expression unter Kontrolle des originalen Riboswitch E* keine Blaufärbung aufwiesen (Abbildung 52).

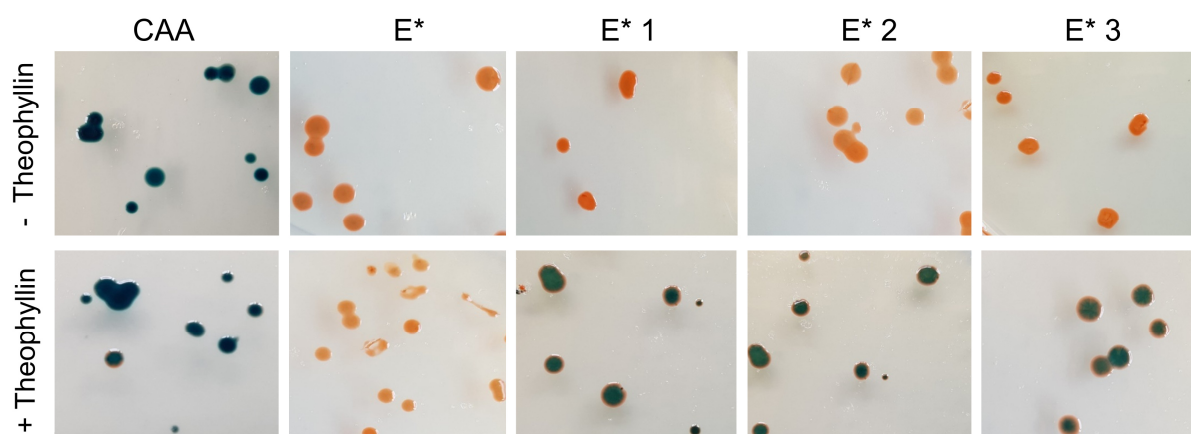


Abbildung 52: Untersuchung der Schaltfähigkeit der Riboswitch E* Varianten in *Hfx. volcanii*. Die jeweiligen Transformanten wurden auf 3 M Festmedium (20 μ g/ml X-Gal) mit und ohne 2 mM Theophyllin ausplattiert und für 4 Wochen bei 25 °C inkubiert.

Um die Schaltfähigkeit zu quantifizieren wurden die entsprechenden Transformanten bis zum Erreichen einer OD von 1,2 (36 h) bzw. 3,0 (54 h) bei 42 °C und 3 M NaCl angezogen. Eine Erhöhung der *bgaH*-Expression durch Theophyllin wurde jedoch bei keiner Variante festgestellt. Hier lag die BgaH-Aktivität mit und ohne Induktor auf Niveau der Hintergrundexpression ausgehend von Riboswitch E* (Daten nicht gezeigt).

Im Fall von Riboswitch E wurden dagegen visuell bei Kultivierung auf Festmedium wie auch über die BgaH-Aktivität keine Unterschiede zwischen dessen Schaltfähigkeit und der Schaltfähigkeit der Riboswitch E Varianten in *Hfx. volcanii* detektiert. Die BgaH-Aktivität bei Anwesenheit von Theophyllin war 3-fach höher als ohne Supplementierung des Mediums mit dem Induktor (Daten nicht gezeigt).

4.4. Validierung des haloarchaealen, Theophyllin-abhängigen Expressionssystems

Zur Validierung des haloarchaealen, Theophyllin-abhängigen Expressionssystems wurde die cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} genauer untersucht. Bei Anwesenheit des Aktivatorproteins GvpE wird die Gasvesikelbildung stark erhöht. GvpE aktiviert die beiden Promotoren P_{pA} und P_{pD} (Hofacker et al., 2004). Inwieweit die Menge an GvpE eine Rolle bei der Aktivierung der beiden Promotoren spielt ist nicht bekannt. Die dosisabhängige Aktivierbarkeit von Riboswitch E ermöglicht es, die Expressionsstärke des *c-gvpE*-Gens durch unterschiedlich hohe Konzentrationen des Induktors zu regulieren. Eine mögliche Korrelation zwischen der cGvpE-Menge und der Aktivierung von P_{pA} kann wiederum mit mGFP6 als Reporter detektiert werden. Zur Generierung von unterschiedlichen cGvpE-Mengen wurde das *c-gvpE* Gen ohne ATG-Start unter Kontrolle von Riboswitch E inklusive der konstanten Region (RE) und P_{fdx} in pPDPAJB18+E gesetzt. Das resultierende Plasmid pPAJB20 (**Abbildung 53**) enthält somit *c-gvpE* unter Kontrolle von Riboswitch E, und in entgegengesetzter Richtung 5'-UTR_D, P_{pD} , die UAS-Sequenzen und P_{pA} stromaufwärts von *mgfp6*. So lag *mgfp6* unter Kontrolle des zu untersuchenden P_{pA} -Promotors. Beide Fragmente sind voneinander durch den t.11Le-Terminator getrennt (**Abbildung 53**).

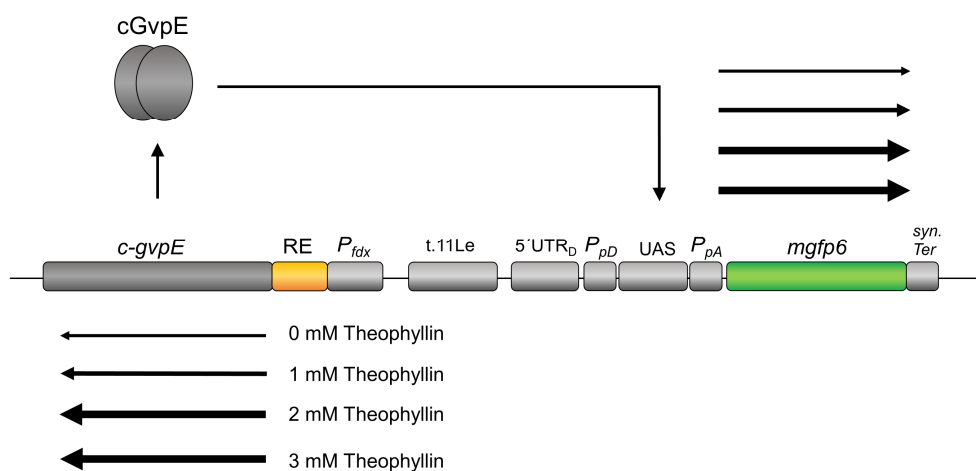


Abbildung 53: Überprüfung der Abhängigkeit der P_{pA} Aktivierung von der GvpE-Menge. Der Vektor pPAJB20 enthält das *c-gvpE*-Gen unter der Kontrolle von Riboswitch E (RE), und in entgegengesetzter Richtung 5'-UTR_D, P_{pD} , die UAS-Sequenzen und *mgfp6* unter Kontrolle von P_{pA} und 5'-UTR_A. Die dosisabhängige Aktivierbarkeit von Riboswitch E ermöglicht die Synthese unterschiedlich großer Mengen an cGvpE, deren Auswirkungen auf P_{pA} mittels der mGFP6-Fluoreszenz detektiert werden können.

Zur Überprüfung einer Korrelation der cGvpE-Menge und der Theophyllin-Konzentration wurden Transformanten mit pPAJB20 in Medium mit 3 M NaCl und unterschiedlichen Theophyllin-Konzentrationen (0, 1, 2 und 3 mM) angezogen und die jeweilige cGvpE-Menge mittels Western-Blot überprüft. Die Auswertung der Western-Analyse zeigte eine steigende cGvpE-Menge mit höher werdender Theophyllin-Konzentration bis 2 mM (**Abbildung 54**). Die Menge an cGvpE wurde somit mit Riboswitch E reguliert.

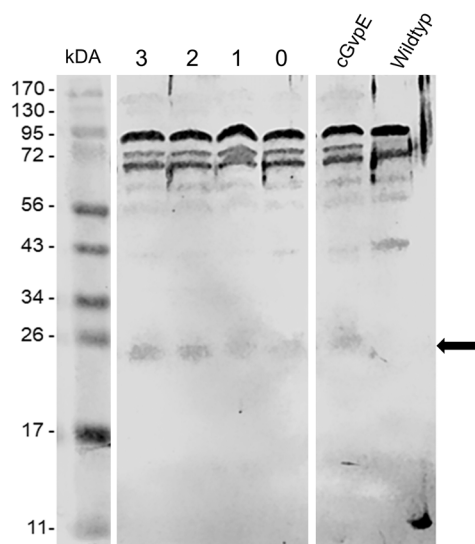


Abbildung 54: Western Analyse zum Nachweis der cGvpE-Menge bei unterschiedlichen Theophyllin-Konzentrationen im Anzuchtmedium. Die Transformanten wurden bei 0, 1, 2 oder 3 mM Theophyllin angezogen, anschließend jeweils 20 mg Gesamtprotein über eine SDS-PAGE separiert und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von cGvpE erfolgte mittels cGvpE-Antiserum sowie eines zweiten Antikörpers, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye 800 CW (LI-COR) gekoppelt wurde. Die Western Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert. Die erwartete Proteingröße von GvpE ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Als Marker wurde der Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder verwendet. 3: 3 mM Theophyllin, 2: 2 mM Theophyllin, 1: 1 mM Theophyllin, 0: 0 mM Theophyllin. cGvpE: isoliertes cGvpE-Protein, Wildtyp: Zelllysate von *Hfx. volcanii* WR340.

Zur Quantifizierung der *mgfp6*-Expression und somit der P_{pA} -Aktivität bei unterschiedlichen cGvpE-Mengen wurden Transformanten mit pPAJB20 in Medium mit 3 M NaCl und unterschiedlichen Theophyllin-Konzentrationen (0, 1, 2 und 3 mM) bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,6 (Inkubation 30 h) angezogen und die Fluoreszenz quantifiziert (**Abbildung 55, Tabelle 25**). Als Vergleich wurde die PDPA+E-Transformante, die *c-gvpE* unter Kontrolle des starken P_{fdx} -Promotors enthält, gewählt (200.000 AU). PDPA-Transformanten (ohne cGvpE) dienten zur Quantifizierung der basalen P_{pA} -Aktivität (AU 18.000).

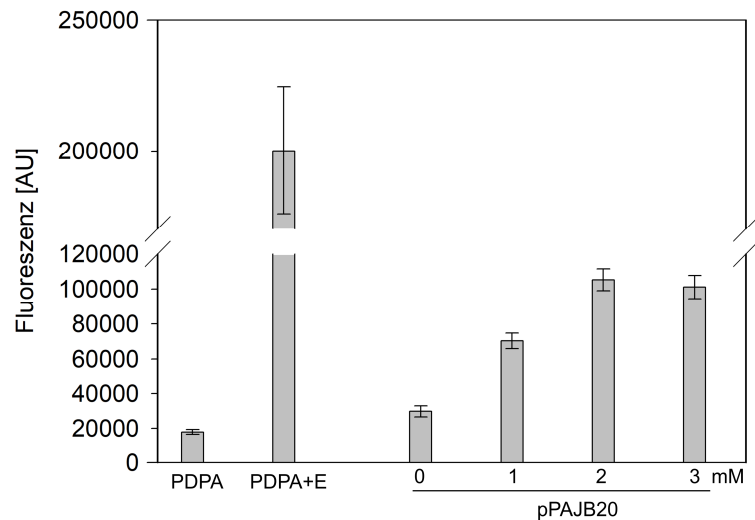


Abbildung 55: P_{pA} -Aktivierung bei unterschiedlichen cGvpE-Mengen *in vivo*. Für eine unterschiedlich starke c-gvpE-Expression wurden Transformanten mit pPAJB20 bei verschiedenen Theophyllin-Konzentrationen inkubiert (3 M NaCl, 37 °C). Die Fluoreszenz der Transformanten wurde nach 30 h Inkubationszeit (OD_{600} von 0,6) gemessen und in *arbitrary units* (AU) angegeben. Die Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 wurde von den Werten subtrahiert. Das Experiment wurde in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. PDPA+E: Transformanten mit c-gvpE unter Kontrolle von P_{fdx} , PDPA: Transformanten ohne Expression von c-gvpE.

Die Quantifizierung des GFP-Signals unter Riboswitch-Kontrolle der jeweiligen Transformanten zeigte einen Anstieg mit steigender Expressionsrate von c-gvpE. Die PAJB20-Transformanten mit einer schwachen c-gvpE-Expression unter Kontrolle von Riboswitch E zeigten mit 30.000 AU eine etwas höhere Fluoreszenz als Zellen mit basaler P_{pA} -Aktivität. Die Zugabe von 1 mM oder 2 mM Theophyllin führte zu einem 4-fach höheren (70.000 AU) bzw. 6-fach höheren GFP-Signal (105.000 AU) im Vergleich zu PDPA-Transformanten. Unterschiede innerhalb der Fluoreszenz von PAJB20-Transformanten bei der Anzucht mit 2 mM und 3 mM Theophyllin (101.000 AU) wurden nicht festgestellt (**Abbildung 55, Tabelle 25**).

Die Ergebnisse zeigen, dass das Theophyllin-abhängige Regulationssystem zur Aktivierung der haloarchaealen Genexpression und auch für die Herstellung eines synthetischen genetischen Schaltkreises in Haloarchaea verwendet werden kann.

Tabelle 25: P_{pA} -Aktivierung bei unterschiedlichen cGvpE-Mengen.

Transformanten	Basale Aktivität [AU]	+cGvpE	Faktor der Aktivierung
Fluoreszenz [AU] x 10 ^{3*}			
PDPA	18 ± 1	200 ± 24	11

Theophyllin-Konzentration	Fluoreszenz [AU]	Faktor der Aktivierung zu PDPA
0	30 ± 3	2
1	70 ± 4	4
2	105 ± 6	6
3	101 ± 7	6

* Es wurden drei biologische und drei technische Replikate angefertigt.

5. Diskussion

Die Expression vieler haloarchaealer Gene wird von der Wachstumsphase der Zellen sowie von Umweltbedingungen wie Sauerstoffverfügbarkeit, Salzkonzentration oder Temperatur beeinflusst (Pfeifer, 2015). Zwar liefern Transkriptom- oder Proteomanalysen globale Daten über die Genexpression, aber um regulatorische Elemente zu charakterisieren, ist die Analyse einzelner Gene und Promotoren immer noch erforderlich. Zur Untersuchung der haloarchaealen Transkriptions- und Translationsregulation stehen nur wenige Reportersysteme oder induzierbare Expressionssysteme zur Verfügung. Die limitierte Anzahl in Haloarchaea ist u. a. der hohen intrazellulären Salzkonzentration und der damit einhergehenden hohen Ionendichte geschuldet (Dennis and Shimmin, 1997), die die Anwendung vieler eukaryotischer und bakterieller regulatorischen Systeme erschwert. Für die meisten Proteine und andere Makromoleküle ohne haloarchaealen oder halophilen Ursprung, sind solche enorm hohen Ionenkonzentrationen verheerend. Sie verursachen eine Verstärkung hydrophober Wechselwirkungen, was zu Proteinaggregationen und Konformationsänderungen in der Proteinstruktur führen kann. Zudem können elektrostatische Wechselwirkungen durch Ladungsabschirmung gestört und die Verfügbarkeit von freiem Wasser wegen Salzhydratation reduziert werden (Dennis and Shimmin, 1997). Daher stellt die hohe Salzkonzentration des haloarchaealen Zytoplasmas eine Barriere für viele eukaryotische oder bakterielle Systeme dar und erfordert deren Adaption an das hypersaline Milieu.

Zur Analyse der haloarchaealen Genexpression wurden bis dato vorrangig enzymatische Assays eingesetzt. Häufig angewandte Reporter sind die beiden haloarchaealen Enzyme beta-Galaktosidase (BgaH) und Dihydrofolatreduktase (Danner and Soppa, 1996; Gregor and Pfeifer, 2001). In *Escherichia coli* (*E. coli*) ist dagegen das grün fluoreszierende Protein (GFP) ein geeigneter Alternativreporter (Lissemore et al., 2000), um vor allem *in vivo*-Analysen durchzuführen. Im Vergleich zu enzymatischen Assays sind Fluoreszenzanalysen mittels GFP weniger zeitaufwendig, benötigen keine zusätzlichen Substrate und/oder Kofaktoren und werden zudem von der Umgebungstemperatur während der Messung nicht beeinflusst. Aufgrund der Vorteile von GFP als Reporter wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein auf smRS-GFP basierendes Reportersystem zur Untersuchung der haloarchaealen Genexpression konstruiert und validiert. Zur Validierung des Reportersystems wurde die gut untersuchte p-vac-Region gewählt. Während der Validierung wurde die Regulation der p-vac-Region weiter untersucht und neben haloarchaealen Promotoren auch Regulatorelemente der Gasvesikelgene charakterisiert. Die Charakterisierung der Regulatorelemente erfolgte auch im Hinblick auf deren Verwendbarkeit in einem Regulatorsystem zur konditionalen Genexpression in Haloarchaea, welches im zweiten Teil der Arbeit konstruiert und untersucht wurde.

Der Vorteil von induzierbaren Expressionssystemen liegt in der Möglichkeit, die Transkription oder Translation bestimmter Gene zu definierten Zeitpunkten an- und auszuschalten. Dies ermöglicht die Untersuchung von Regulatoren ohne Expressionshintergrund sowie die Analyse deren Funktion bei der Genexpression. In Bakterien und Eukaryoten werden induzierbare Expressionssysteme genutzt, um

Stoffwechselwege oder Genregulationen zu untersuchen sowie heterolog Proteine zu synthetisieren (Geraskina et al., 2019; Honjo et al., 2019; Martins-Santana et al., 2018). Als Regulationselemente zur konditionalen Genexpression sind in Haloarchaea lediglich die beiden Promotoren *p.tnA* und *P_{kdp}*, deren Steuerung ausgehend von nicht inerten Liganden erfolgt, bekannt (Allers et al., 2010; Kixmuller and Greie, 2012). Da diese Liganden metabolisiert werden können, kann eine Veränderung der physiologischen Eigenschaften der Zelle nicht ausgeschlossen werden. Somit können diese Promotoren zur Untersuchung der haloarchaealen Genregulation nur bedingt verwendet werden. In Bakterien und Eukaryoten steht hingegen eine Vielzahl von Regulationssystemen zur Verfügung, deren Induktoren nicht natürlich in den Zellen vorkommen, wie z. B. die synthetischen Theophyllin-abhängigen Riboswitche A bis E sowie E* von Gallivan (Topp et al., 2011). Zum Aufbau haloarchaealer, steuerbarer Expressionssysteme wurden die Theophyllin-abhängigen Riboswitche getestet und mit haloarchaealen Regulatorelementen kombiniert.

5.1. GFP-Reportersystem

Die Anwendung von Fluoreszenzproteinen in Haloarchaea ist aufgrund der hohen intrazellulären Salzkonzentration und Wachstumstemperaturen von meist über 40 °C eingeschränkt (Cormack et al., 1996; Enoki et al., 2004; Nomura and Harada, 1998; Robinson et al., 2005; Stepanenko et al., 2014). Die unter Hochsalzbedingungen funktionsfähige GFP-Variante smRS-GFP zeigte in Haloarchaea ein ausreichendes Signal zur Untersuchung des Proteinabbaus, war jedoch zur Quantifizierung des schwachen *P_{pd}*-Promotors zu gering. Um eine GFP-Variante zu generieren, die die Quantifizierung von schwachen Promotoren ermöglicht, wurden in smRS-GFP verschiedene Mutationen zur Verbesserung des Fluoreszenzsignals eingefügt.

Eine der ersten verbesserten GFPs ist das vielfach angewandte *enhanced* GFP (eGFP), welches in *E. coli* eine deutlich höhere Fluoreszenz als das Wildtyp-GFP (wtGFP) aufweist (Cubitt et al., 1995; Kremers et al., 2011). Die höhere Fluoreszenz beruht auf einer besseren Faltungseffizienz, die zu einem höheren Anteil korrekt gefalteter GFP-Moleküle bei 37 °C führt (Arpino et al., 2012; Patterson et al., 1997). Die Reifung von fluoreszierenden Proteinen wird durch die Inkubationstemperatur der zu untersuchenden Organismen beeinflusst. So zeigte Patterson *et. al.* einen deutlichen Rückgang der GFP-Fluoreszenz in *E. coli* bei der Anzucht der Zellen bei über 28 °C (Patterson et al., 1997). eGFP enthält neben der S65T-Substitution die Mutationen F64L, die smRS-GFP fehlt. Der Austausch des Phenylalanins mit Leucin an Position 64 führt zu einer Verbesserung der Reifungsrate bei 37 °C, was in *E. coli* in einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenz resultierte (Arpino et al., 2012; Cormack et al., 1996; Patterson et al., 1997). Die Kombination der smRS-Mutationen und der F64L-Substitution führte zur GFP-Variante GFP+, die *in vivo* ein 130-fach stärkeres Fluoreszenzsignal im Vergleich zu wtGFP aufweist (Scholz et al., 2000). Durch die Substitution F64L in smRS-GFP (mGFP2) wurde eine 2,5-fach höhere Fluoreszenz in *Hfx. volcanii* erreicht (**Abbildung 12**). Die höhere Fluoreszenz von mGFP2 im Vergleich zu smRS-GFP rührt wahrscheinlich von einem deutlich höheren Anteil an korrekt gefalteten GFP-Molekülen in *Hfx. volcanii*.

Neben der hohen Inkubationstemperatur nimmt auch die hohe intrazelluläre Salzkonzentration Einfluss auf die GFP-Fluoreszenz. So können hohe Ionenkonzentrationen zu einer Konformationsänderung von GFP führen sowie die Selbstaggregation- und Dimerisierungstendenz erhöhen (Dennis and Shimmin, 1997; Deschamps et al., 1995; Ishii et al., 2007). Die denaturierenden Auswirkungen hoher Salzkonzentrationen werden bei der Reinigung von GFP zu Nutze gemacht. So erfährt GFP in Hochsalzbedingungen eine Konformationsänderung, was zur Exposition hydrophober Bereiche führt, die mit einer hydrophoben Oberfläche wechselwirken. Die Elution der gebundenen GFP-Moleküle erfolgt durch Reduzierung der Salzkonzentration (Deschamps et al., 1995). Die Konformationsänderung wie auch die erhöhte Aggregationstendenz von Proteinen im hypersalinen Milieu rührt von verstärkten hydrophoben Wechselwirkungen (Dennis and Shimmin, 1997). Um einer Aussalzung im Hochsalz entgegenzuwirken, besitzen haloarchaeale Proteine einen geringen Anteil an hydrophoben Aminosäuren, was diese generell löslicher im hypersalinen Milieu macht (Dennis and Shimmin, 1997). In Haloarchaea zeigte eGFP, dem die hydrophilen Mutationen P99S, M153T, V163A fehlen, eine signifikant geringere Fluoreszenz als smRS-GFP (Reuter and Maupin-Furlow, 2004). Neben den P99S-, M153T- und V163A-Mutationen erhöhen auch die Substitutionen der hydrophoben Aminosäuren Alanin, Leucin und Phenylalanin an den Positionen 206, 221 und 223 durch ihre hydrophilen, positiv-geladenen Analoga Arginin oder Lysin die Löslichkeit von GFP und beseitigen dessen Dimerisierungsverhalten (Zacharias et al., 2002). Durch den Austausch der hydrophoben Aminosäuren im Dimerisierungsbereich konnten monomere GFP-Moleküle generiert werden. So reduziert die A206K-Substitution die Dimerisierungs-Bindungsaffinität um das 740-fache auf 74 mM (Zacharias et al., 2002).

In Haloarchaea zeigten die Mutation A206K (mGFP3) wie auch die Substitutionen F221K, F223R und A206K (mGFP4) keine Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität von mGFP2 (**Abbildung 12**). Dies deutet auf eine bereits gute Löslichkeit von smRS-GFP hin, wie sie in früheren Studien für cycle3-GFP aufgrund der Mutationen P99S, M153T, V163A unter Nicht-Hochsalzbedingungen beschrieben wurde (Pédelacq et al., 2005). Somit hat die Inkubationstemperatur einen größeren Einfluss auf die smRS-GFP Fluoreszenz als die hohe intrazelluläre Salzkonzentration in *Hfx. volcanii*.

Eine der in *E. coli* und Säugetierzellen am meisten verwendeten GFP-Varianten ist sfGFP, dessen gute Faltungs- und Stabilitätseigenschaften auf den beiden Substitutionen S30R und Y39N beruhen (Pédelacq et al., 2005). Weitere Mutationen, die die Faltung, Reifung und Proteinstabilität bei höheren Temperaturen verbessern, sind die Substitutionen N149K und S147P (Baffour-Awuah et al., 2005; Choi et al., 2017; Cubitt et al., 1999; Kimata et al., 1997; Pédelacq et al., 2005; Tsien, 1998). Die Einführung dieser vier Mutationen in mGFP4 (resultierend in mGFP5) führte zu einer 2,9-fach erhöhten Fluoreszenz im Vergleich zu smRS-GFP und verdeutlicht den größeren Einfluss der Temperatur auf die Reifung und Faltung von smRS-GFP als der hohe Salzgehalt im haloarchaealen Zytoplasma (**Abbildung 12**).

Die S72A-Mutation ist für eine verbesserte GFP-Stabilisierung und Faltung in *E. coli* bekannt (Cubitt et al., 1999), insbesondere in Kombination mit F64L, S65T und N149K (Teerawanichpan et al., 2007). Das resultierende mGFP6 zeigte die stärkste Fluoreszenz (3,3-facher Anstieg) im Vergleich zu smRS-GFP und

ein 1,2-fach höheres Signal als mGFP5 (**Abbildung 12**). Aufgrund eines PCR-Fehlers wurde neben der S72A-Mutation unbeabsichtigt an Position 69 Glutamin durch Methionin ersetzt. Die Q69M-Mutation erhöht die Fotostabilität und reduziert die Empfindlichkeit gegenüber Chloridionen sowie niedrigen pH-Werten in gelbfluoreszierenden Proteinen (YFPs) (Griesbeck et al., 2001). Die Chromophorstruktur von YFP ist nicht mit der von GFP vergleichbar (Tsien, 1998), weshalb die Substitution von Q69M wahrscheinlich keine Wirkung in mGFP6 hat.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die Temperatur einen viel größeren Einfluss auf die smRS-GFP-Fluoreszenz besitzt als die hohe intrazelluläre Salzkonzentration von *Hfx. volcanii*. Diese Temperatursensitivität konnte durch die Einführung stabilisierender Substitutionen reduziert werden. Die Reduzierung der Hydrophobizität von smRS-GFP wie auch die Veränderungen im Dimerisierungsbereich zeigten keine Auswirkungen auf die smRS-GFP-Fluoreszenz und bescheinigen smRS-GFP eine gute Löslichkeit im haloarchaealen Zytoplasma. Insgesamt führte die Insertion von 10 verschiedenen Substitutionen zu einer 3,3-fach höheren Fluoreszenz von mGFP6 im Vergleich zu smRS-GFP. Das mGFP6-Signal zeigte eine ausreichend hohe Intensität, um die Stärke des schwachen Promotors P_{pD} zu quantifizieren. Die Eignung des hier entwickelten mGFP6-Reporters wurde im Anschluss validiert.

5.2. Validierung des mGFP6-Reporters

Zur Validierung von mGFP6 als Reporter zur Quantifizierung einer Promotoraktivität wurde der *mgfp6*-Leserahmen unter Kontrolle verschiedener Promotoren exprimiert und die Fluoreszenz in *Hfx. volcanii* quantifiziert. Zudem wurde mittels mGFP6 die Regulation der p-vac-Region weiter untersucht.

5.2.1. mGFP6 ermöglicht die Charakterisierung verschiedener haloarchaealer Promotoren

Als starke Promotoren wurden die beiden *housekeeping*-Promotoren P_{fdx} und P_2 von *Hbt. salinarum* gewählt. P_{fdx} kontrolliert die Expression des [2Fe-2S] *Ferredoxin*-Gens und P_2 die Transkription der ribosomalen 16S rRNA. Zur Analyse einer moderat bis schwachen Expression dienten die vier Promotoren P_{pA} , P_{pO} , P_{pD} und P_{pF} der p-vac-Region.

Die höchste Fluoreszenz und somit die stärkste *mgfp6*-Expression wurde unter Kontrolle von P_{fdx} detektiert, gefolgt von P_2 . Im Falle von P_{fdx} wurde über die gesamte exponentielle Wachstumsphase eine konstante Fluoreszenz der Zellen bis zum Beginn der stationären Wachstumsphase detektiert (**Abbildung 14, Tabelle 10**). [2Fe-2S]-*Ferredoxin* dient wie NAD^+/NADH als Elektronenträger und ist z. B. bei Oxidationsreaktionen im Zitronensäurezyklus beteiligt (Falb et al., 2008; Kerscher and Oesterhelt, 1977; Pfeifer et al., 1993a). Bezogen auf den Gesamtproteingehalt in *Hbt. salinarum* beträgt der Anteil von *Ferredoxin* 2% (Pfeifer, 2015). Die dominante Produktion der [2Fe-2S]-*Ferredoxin*-mRNA während der exponentiellen Wachstumsphase beruht auf dem hohen *Ferredoxin*-Bedarf der Zellen in frühen Wachstumsstadien der Zellen, der mit einer höheren Stoffwechselrate einhergeht.

Der P_2 -Promotor zeigte während des gesamten Wachstums eine konstant hohe Aktivität (**Abbildung 14, Tabelle 10**). P_2 kontrolliert die Transkription der 16S rRNA (Reuter and Maupin-Furlow, 2004), das in allen Wachstumsphasen in gleichbleibend hoher Menge benötigt wird. Die reduzierte Fluoreszenz in der späten stationären Phase resultierte wahrscheinlich aus einer verringerten Zellviabilität.

Im Gegensatz zu P_{fdx} und P_2 führten die Promotoren der Gasvesikelgene zu wesentlich geringeren $mgfp6$ -Expressionen und wiesen während des gesamten Wachstums ein variierendes Aktivitätsmuster auf. Die höchste $mgfp6$ -Expression unter Kontrolle der basalen Aktivität von P_{pA} wurde in der frühen exponentiellen Wachstumsphase detektiert. Im weiteren Wachstumsverlauf zeigte sich eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz der Zellen, die in der späten Wachstumsphase wieder auf ein ähnliches Niveau wie in der frühen exponentiellen Wachstumsphase anstieg (**Abbildung 14, Tabelle 10**). P_{pA} kontrolliert die Transkription von $p\text{-gvpACNO}$, was zu großen Mengen an $p\text{-gvpA}$ - und geringen Mengen an $p\text{-gvpAC}$ -, $p\text{-gvpACN}$ - und $p\text{-gvpACNO}$ -Transkripten führt (Offner et al., 1996). Das variierende Expressionsmuster zeigt eine hohe Produktion der beiden Strukturproteine GvpA und GvpC und/oder GvpN sowie GvpO im frühen Wachstum und im späten Alter der Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, bei denen die haloarchaeale beta-Galaktosidase (BgaH) als Reporter verwendet wurde (Hofacker et al., 2004). Gasvesikel befähigen die Zellen, innerhalb der Wassersäule ohne großen Energieaufwand zu flotieren und so in günstigere Wasserschichten zu gelangen. So scheint die Gasvesikelbildung besonders in der frühen und der späten Wachstumsphase der Zellen besonders erhöht zu sein.

Der in gleiche Richtung wie P_{pA} orientierte P_{pO} -Promotor kontrolliert die Synthese des *leaderlosen* $p\text{-gvpO}$ -Transkriptes, welches in großen Mengen in der exponentiellen Phase nachgewiesen wurde (Offner et al., 1996). Die höchste Aktivität von P_{pO} wurde in der frühen Wachstumsphase beobachtet. Im weiteren Verlauf des exponentiellen Wachstums nahm die Fluoreszenz der Zellen ab, stieg zu Beginn der stationären Wachstumsphase an und nahm in der späten stationären Wachstumsphase erneut ab (**Abbildung 14, Tabelle 10**). Die Funktion von GvpO ist bislang nicht bekannt. Das Protein ist allerdings essentiell für die Gasvesikelbildung. Aufgrund der im Vergleich zur basalen Aktivität von P_{pA} viel höheren Aktivität von P_{pO} in der frühen exponentiellen Phase scheint GvpO eine wichtige Rolle im Anfangsstadium der Gasvesikelbildung spielen.

Die niedrigste basale Aktivität zeigte der P_{pD} -Promotor (**Abbildung 14, Tabelle 10**). In *Hbt. salinarum* kontrolliert P_{pD} die Synthese des Transkripts $p\text{-gvpDE}$, welches für den Transkriptionsaktivator pGvpE und dessen Gegenspieler pGvpD codiert. P_{pD} wird wie P_{pA} von pGvpE aktiviert, was zu einer viel höheren Expression der beiden regulatorischen Proteine pGvpD und pGvpE führt (Hofacker et al., 2004). In dieser Arbeit wies P_{pD} die höchste Aktivität in der frühen exponentiellen Wachstumsphase auf, gefolgt von einem kontinuierlichen Rückgang der Fluoreszenz der Zellen während des gesamten Wachstumsverlaufs. Dies zeigt, dass die Synthese von pGvpD und pGvpE früh erfolgt und P_{pD} vermutlich sehr früh in der Gasvesikelbildung von pGvpE induziert wird. In Northern-Analysen mit Gesamt-RNA von *Hbt. salinarum* PHH1 wurde die $p\text{-gvpDE}$ -mRNA nur in der stationären Wachstumsphase nachgewiesen (Offner and

Pfeifer, 1995), was auf eine geringe Menge des Transkripts zu Beginn der Gasvesikelentstehung deutet. Vermutlich lag die Menge der *p-gvpDE*-mRNA unter der Nachweisgrenze des Northern Blots und erreichte womöglich erst durch die Aktivierung von P_{pD} durch pGvpE in der stationären Phase die nachweisbare Menge.

Wie P_{pD} weist P_{pF} ebenfalls eine sehr geringe Aktivität auf, wird im Gegensatz zu P_{pD} aber nicht von pGvpE aktiviert (Hofacker et al., 2004). Der P_{pF} -Promotor zeigt ein ähnliches wachstumsphasenabhängiges Muster wie die basale Aktivität von P_{pD} . Auch in dieser Arbeit wurde die höchste mGFP6-Fluoreszenz in der frühen exponentiellen Wachstumsphase detektiert und ein Rückgang mit zunehmendem Alter der Zellen verzeichnet (**Abbildung 14, Tabelle 10**). Die höhere Aktivität von P_{pF} in der frühen exponentiellen Wachstumsphase unterstreicht die frühe Produktion der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF bis GvpM, die in geringen Mengen in der Anfangsphase der Gasvesikelbildung benötigt werden und offenbar miteinander interagieren (Offner et al., 2000; Winter et al., 2018).

Bei allen sechs in dieser Arbeit getesteten Promotoren wurde ein unterschiedliches zeitliches Aktivitätsmuster beobachtet. Im Fall der *p-vac*-Region wiesen alle Promotoren die höchste Aktivität in der frühen exponentiellen Wachstumsphase auf, was eine relativ hohe Produktion der Gasvesikelproteine bereits in frühen Stadien des Wachstums zeigt (**Abbildung 14, Tabelle 10**). Die Verwendung von mGFP6 ermöglichte eine sehr einfache Quantifizierung dieser unterschiedlichen Promotoraktivitäten *in vivo* und somit die Charakterisierung der Promotoren über die Zeit. Wegen des langsamen Wachstums der Haloarchaea (Generationszeit von 4 h) bleibt GFP auch genügend Zeit, seine korrekte Faltung einzunehmen und sich ändernde Promotoraktivitäten anzuzeigen.

5.2.2. Regulation der Translation von *p-gvpA*, *p-gvpO*, *p-gvpD* und *p-gvpF*

Die Proteinsynthese ist der energetisch aufwendigste Prozess in der Zelle (Powers et al., 2012). Um die Energiekosten der Proteinproduktion in Balance mit dessen Nutzen zu halten, wird die Translation durch verschiedene Mechanismen gesteuert. Die Regulation erfolgt meist bei der Translationsinitiation, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Sekundärstrukturen in der 5'-UTR sowie der Kontext des Startcodons können die Translationsinitiation beeinflussen und so auf die Expressionsrate wirken (Behloul et al., 2017; Kozak, 1986).

In Bakterien und Eukaryoten beeinflussen viele 5'-UTRs die Translation (Kaberdin and Bläsi, 2006; Li et al., 2017). Neben Sekundärstrukturen können innerhalb dieser *leader*-Bereiche Bindungsstellen für regulatorische Proteine, kleine regulatorische RNAs oder Metaboliten (Riboswitche) enthalten sein. Außerdem befindet sich in bakteriellen 5'-UTRs die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz), die die Bindungsstelle zur 16S rRNA in der ribosomalen 30S-Untereinheit darstellt und den Startpunkt der Translation markiert (Cho et al., 2017).

In Haloarchaeen sind etwa 30% der mRNAs ohne 5'-UTR ausgestattet (Brenneis et al., 2007), wie z. B. die in großen Mengen vorkommende mRNA des *Ferredoxin*-Gens (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). In früheren Studien konnte anhand des p-gvpH-Gens eine Erhöhung der Translationsrate in Abwesenheit von 5'-UTR_H beobachtet werden (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Auch in dieser Arbeit wurde anhand der Deletion der 5'-UTR von p-gvpACNO (5'-UTR_A), p-gvpDE (5'-UTR_D) und p-gvpFGHIJKLM (5'-UTR_F) mittels mGFP6 als Reporter eine deutliche Erhöhung der Expression insbesondere im frühen Wachstumsstadium beobachtet (**Abbildung 21, Tabelle 13**).

Beim Fehlen von 5'-UTR_A wurde in der frühen exponentiellen Wachstumsphase ein 1,4- bis 2,4-facher Anstieg der Fluoreszenz verzeichnet. In Anwesenheit von 5'-UTR_A zeigte sich eine Reduktion der Fluoreszenz innerhalb des exponentiellen Wachstums. Diese Reduktion wurde beim Fehlen der 5'-UTR_A nicht mehr detektiert (**Abbildung 21, Tabelle 13**). Damit begrenzt die 5'-UTR die Expression eines gvpA-Leserahmens. In *Hfx. volcanii* wurde eine von der 5'-UTR sowie der 3'-UTR ausgehende, wachstumsabhängige Regulation des *hoxA-like-transcriptional-regulator*-Gens und des *conserved-hypothetical-protein*-Gens nachgewiesen (Brenneis and Soppa, 2009). Beide *leader*-Bereiche alleine konnten den wachstumsabhängigen Effekt auf die Translation nicht erzeugen (Brenneis and Soppa, 2009). Im Fall der Translation der p-gvpA-mRNA scheint die 5'-UTR_A auch ohne die 3'-UTR ausschlaggebend für die wachstumsabhängige Translationsregulation zu sein. Dies zeigt eine vielfältige Funktion der haloarchaealen 5'-UTRs und einen spezifischen Effekt auf die Expression der entsprechenden Gene.

Im Gegensatz dazu führte die Deletion des 5'-UTR_D und 5'-UTR_F zu einer bis zu 15,0-fach bzw. 2,9-fach höheren Translation während des gesamten Wachstums im Vergleich zu dem jeweiligen Transkript mit 5'-UTR (**Abbildung 21, Tabelle 13**). Somit wurde auch im Falle von p-gvpD und p-gvpF eine reduzierende Wirkung der 5'-UTR auf deren Translation detektiert.

In *Hfx. volcanii* resultierte die Insertion einer artifiziellen Sekundärstruktur nahe dem AUG-Startcodon in einer Inhibierung der Translation (Hering et al., 2009). Bioinformatische Analysen weisen auf Sekundärstrukturen in 5'-UTR_A, 5'-UTR_D und 5'-UTR_F hin, die den Kontext des AUG-Startcodons mit einbeziehen (**Abbildung 15**). Diese Sekundärstrukturen könnten die Translationsinitiation stören und für die negative Regulation der Translation verantwortlich sein. So könnte das Fehlen der Sekundärstruktur zu einer besseren Zugänglichkeit des Ribosoms führen, was in einer höheren Expressionsrate resultiert. In Eukaryoten wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Stabilität von Sekundärstrukturen sowie deren Position und der Stärke der Translationsexpression nachgewiesen (Baim and Sherman, 1988). Die Insertion einer Haarnadelschleife direkt vor dem Startcodon führte hier zu einer kompletten Inhibierung der Translation, wobei der Grad der Hemmung mit der Stabilität und der Nähe der Sekundärstruktur einherging (Baim and Sherman, 1988).

Wie beim Fehlen der 5'-UTR wurde auch in Abwesenheit der Nukleotide zwischen Position +4 und +15 von p-gvpD, p-gvpF und p-gvpO eine deutliche Erhöhung der Expression ab der mittleren exponentiellen Wachstumsphase festgestellt (**Abbildung 17, Tabelle 11**). In der frühen exponentiellen Wachstumsphase

wurden dagegen keine Unterschiede zwischen der An- und Abwesenheit dieser zwölf Nukleotide stromabwärts des AUG-Startcodons verzeichnet (**Abbildung 17, Tabelle 11**). Ob die Erhöhung aufgrund einer sich nicht ausbildenden Sekundärstruktur um das AUG-Startcodon erfolgt oder ob in diesem Bereich ein weiteres, der eukaryotischen Kozak-Sequenz ähnliches, regulatorisches Element befindet, kann nicht ausgesagt werden. Bei einer Mehrzahl von eukaryotischen Transkripten mit 5'-UTR reguliert die Kozak-Sequenz, die eine Konsensus-Sequenz der dem AUG-Start flankierenden Nukleotide darstellt, deren Translationseffizienz. Je nach Übereinstimmung mit der optimalen Kozak-Sequenz können die Translationsstartstellen als stark oder schwach klassifiziert werden. Mutationen an Position -3 und +4 innerhalb der Kozak-Sequenz führen zu Veränderungen der Translationseffizienz um den Faktor 20 (Kozak, 1986; Kozak, 1997). In Haloarchaea wurde für die Transkripte der Hsp72-Proteinfamilie, die Chaperone und Hitzeschockproteine beinhaltet, jeweils eine der Kozak-Sequenz ähnliche Konsensus-Sequenz identifiziert. Substitutionen der Nukleotide, die den AUG-Start flankieren, führen besonders an der Position +4 zu deutlichen Veränderungen der Expressionsrate, die je nach Art des ausgetauschten Nukleotids zu- oder abnimmt (Chen et al., 2015).

Um letztendlich die Frage zu klären, ob eine Sekundärstruktur und/oder eine haloarchaeale Kozak-Sequenz einen negativen Einfluss auf die Translation ausübt, sind weitere Untersuchungen nötig. Im ersten Schritt sollten mögliche Sekundärstrukturen in den 5'-UTRs der Transkripte der p-vac-Region experimentell bestimmt werden. Da RNA-Strukturen von der Salzkonzentration beeinflusst werden (Tan and Chen, 2011), ist der Fokus auf eine Strukturbestimmung *in vivo* zu legen. Eine zur Strukturanalyse von RNAs *in vivo* geeignete Methode stellt u. a. SHAPE (*Selective 2' Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension*) dar. Durch den Austausch der sich paarenden Nukleotide mit nicht strukturbildenden CAA-Repeats könnte der Einfluss von Sekundärstrukturen innerhalb der 5'-UTRs auf die Expression der p-vac-Region weiter analysiert werden. Zur Identifikation einer haloarchaealen Kozak-Sequenz könnten die Auswirkungen von Substitutionen einzelner Nukleotide im Kontext des AUG-Startcodons detektiert werden. Zudem könnte so eine Aussage, ob der komplette Bereich zwischen +4 und +15 oder einzelne Positionen ausschlaggebend für die Verringerung der Genexpressionsrate sind, getroffen werden.

Die negative Regulation der Genexpression durch die 5'-UTRs und/oder den an Position +4 und +15 liegenden Nukleotiden könnten zur Feinregulation der Expression der p-vac-Region dienen. So könnten diese Regulatorelemente transkriptspezifisch die Translation steuern und zu einer definierten Menge an Gasvesikelproteinen führen. Die Gasvesikelassemblierung setzt ein ausbalanciertes Mengenverhältnis zwischen bestimmten Gasvesikelproteinen voraus. So wurde durch eine Überexpressionen von p-gvpG, p-gvpH oder p-gvpM zusätzlich zur Expression der p-vac-Region die Gasvesikelbildung inhibiert (Tavlaridou et al., 2013). Die *leader*-Bereiche wie auch die Nukleotide um den AUG-Start der p-vac-Region könnten das erforderliche Verhältnis der einzelnen Gasvesikelproteine bestimmen und somit eine effiziente Gasvesikelbildung gewährleisten.

5.2.3. GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD}

Auf Transkriptionsebene wird die p-vac-Region über die beiden Regulatorproteine GvpE und GvpD gesteuert. Während GvpE als Transkriptionsaktivator P_{pA} und P_{pD} induziert, wirkt GvpD reprimierend auf die GvpE-vermittelte Aktivierung der beiden Promotoren. Für die Aktivierung durch GvpE sind die zwischen P_{pA} und P_{pD} lokalisierten UAS-Sequenzen (*upstream activator sequence*) notwendig. Mit BgaH als Reporter wurde eine 70- bis 100-fache Aktivierung der basalen Stärke von P_{pA} und eine 20- bis 40-fache Aktivierung von P_{pD} durch GvpE detektiert (Gregor and Pfeifer, 2001). Die Quantifizierung mittels mGFP6 zeigte eine deutlich niedrigere GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} . So wurde eine 11-fache Erhöhung der basalen Aktivität von P_{pA} und eine 8-fache Verstärkung der basalen Aktivität von P_{pD} detektiert (**Abbildung 24, Tabelle 14**). Die induzierte P_{pA} -Aktivität lag im Bereich des konstitutiven, ribosomalen P2-Promotors (**Abbildung 25**). In beiden Analysen erwies sich der P_{pA} -Promotor stärker als P_{pD} . Hier wurde eine 7- bis 10,5-fach höhere Aktivität von P_{pA} im Vergleich zu P_{pD} detektiert.

Einen positiven Effekt auf die GvpE-vermittelte Aktivierung zeigte der *leader*-Bereich von p-gvpD. Im Fall von P_{pD} wurde in Abwesenheit von 5'-UTR_D nur noch eine bis zu 5-fache Aktivierung des Promotors detektiert (**Abbildung 29, Abbildung 33** sowie **Tabelle 14, Tabelle 18**). Innerhalb der 5'-UTR_D befindet sich ein kleiner, mit einem GUG-Codon beginnender offener Leserahmen, der für ein 21 Aminosäuren langes Protein kodieren könnte. Die Substitution des GUG-Codons in ein Stopcodon (TAA) führte aber zu keiner Veränderung der cGvpE-vermittelten Aktivierung P_{pD} (Daten nicht gezeigt). Somit scheint der kleine Leserahmen und das von ihm möglicherweise codierte Protein keine Wirkung auf die GvpE-vermittelte Induktion von P_{pD} zu besitzen.

Bioinformatische Studien von 5'-UTR_D ergaben die drei putative Sekundärstrukturen S1, S2 und S3, die UAS-ähnliche Sequenzen aufweisen. In allen drei Sekundärstrukturen wurden putative GvpE-Interaktionsstellen mit einer Sequenzähnlichkeit von mindestens 50%, gefunden (**Abbildung 34**). Zur Analyse der Funktion von 5'-UTR_D wurden diese Sequenzen einzeln oder in Kombination mit den nicht strukturbildenden CAA-Repeats ausgetauscht (**Abbildung 35, Abbildung 36**) und der Einfluss auf die basale Expression sowie auf die cGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} *in vivo* untersucht. Die Auflösung der Sekundärstrukturen des 5'-UTR_D führte in allen Fällen zu einem Anstieg der basalen Expression. So wurde bei Abwesenheit von S1 oder S2 sowie beim Fehlen beider Sekundärstrukturen eine Verdopplung der P_{pD} -Aktivität mittels mGFP6 detektiert (**Abbildung 37, Tabelle 20**). Die Sekundärstruktur S1 bildet sich bereits am Beginn des 5'-UTR_D aus, während S2 in der Mitte dieses Bereichs lokalisiert ist. Der Austausch der Sequenzen von S1 und S2 mit den CAA-Repeats resultierte vermutlich in ein effizienteres Ablesen der mRNA durch das Ribosom aufgrund der fehlenden Sekundärstrukturen und somit zu einer Erhöhung der Translationsrate.

Einen deutlich größeren Einfluss auf die basale Expression zeigte S3. So wurde bei dessen Abwesenheit (aber in Gegenwart von S1 und S2) eine 3,5-fache Erhöhung der basalen Expression detektiert. Beim Fehlen von S3 und S1 wurde ein 4-facher und beim Fehlen von S3 und S2 ein 3-facher Anstieg der

Fluoreszenz der Zellen nachgewiesen (**Abbildung 37, Tabelle 20**). Die Sekundärstruktur S3 entsteht durch die Basenpaarung der letzten sechs Nukleotide der 5'-UTR_D mit den ersten acht Nukleotiden von p-gvpD und enthält somit das AUG-Startcodon (**Abbildung 34**). Die ersten 15 nt der p-gvpD-mRNA zeigten einen negativen Einfluss auf deren Translation (**Abbildung 17, Tabelle 11**), was vermutlich auf die sich ausbildende Sekundärstruktur zurückzuführen ist. Die Ausbildung von S3 könnte also den Zugang zum AUG-Startcodon für das Ribosom erschweren und somit die Translationseffizienz herabsetzen. Der Einfluss der Sekundärstrukturen von 5'-UTR_D auf die basale Expression zeigte sich deutlich beim Auflösen aller drei putativen Sekundärstrukturen. So wurde beim Fehlen von S1, S2 und S3 ein 10-facher Anstieg des mGFP6-Signals *in vivo* detektiert (**Abbildung 37, Tabelle 20**).

Die Auflösung der einzelnen putativen Sekundärstrukturen besaß in allen Fällen auch Auswirkungen auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} . So wurde in Gegenwart des nativen *leader*-Bereichs eine 12-fache Aktivierung von P_{pD} durch cGvpE nachgewiesen, während die Abwesenheit der einzelnen Sekundärstrukturen immer zu einer geringeren Aktivierung von P_{pD} durch cGvpE führte. Der größte Einfluss wurde bei S1 beobachtet. Dessen alleinige Auflösung sowie bei zusätzlicher Deletion von S2 führte dies lediglich zu einer Verdopplung des mGFP6-Signals. In Abwesenheit von S1 und S3 wurde dagegen eine 7-fach höhere Fluoreszenz im Vergleich zur Anwesenheit dieser beiden Sekundärstrukturen *in vivo* gemessen. Die Abwesenheit von S2 oder S3 resultierte dagegen in eine jeweils 11-fache Aktivierung von P_{pD} durch cGvpE und somit nur in eine leichte Reduktion der Induzierbarkeit (**Abbildung 37, Tabelle 20**). Ein Vergleich der Sequenz von S1 mit den vier UAS ergab eine Übereinstimmung zwischen 50% und 75% (**Abbildung 34**). Laut Strukturvorhersage bildet sich S1 am Anfang der *leader*-Region aus und könnte neben den UAS-Sequenzen als weitere Interaktionsstelle für GvpE fungieren. Dies würde aber eine Interaktion von GvpE und dem 5'-UTR_D und somit eine Protein-RNA-Interaktion voraussetzen. In Bakterien wurde eine Interaktion des Repressorproteins CsrA (*carbon storage regulator*) an sRNAs und mRNAs festgestellt (Liu et al., 1997; Romeo, 1998; Romeo et al., 2013; Weillbacher et al., 2003). Mutationsanalysen zeigten eine für die CsrA-Bindung notwendige Konsensus-Sequenz, die sich meist in *Hairpin*-Strukturen der Ziel-RNA befindet. So spielen neben der Konsensus-Sequenz auch Sekundärstrukturen der RNA innerhalb der CsrA-RNA-Erkennung eine Rolle (Dubey et al., 2005). Ähnlich wie bei CsrA könnten die 5'-UTR_D und GvpE wechselwirken und deshalb eine Regulation der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} nicht ausgeschlossen werden. In *Hfx. volcanii* wurden fast 2800 sRNAs nachgewiesen (Kliemt et al., 2019), von denen einige bei verschiedenen Salzkonzentrationen unterschiedlich stark synthetisiert wurden. So wurden die sRNAs Hts5, Hts71 und Hts107 bei einer Salzkonzentration von 2,5 M schwächer und bei einem Salzgehalt von 2,1 M stärker gebildet (Heyer et al., 2012). Dies lässt eine Rolle von sRNAs bei der Adaption von *H. volcanii* an verschiedenen Salzkonzentrationen vermuten. Die Gasvesikelbildung ist neben weiteren Faktoren auch von der Salzkonzentration abhängig. So könnten neben den Promotoren der p-vac auch sRNAs, wie möglicherweise 5'-UTR_D, eine Rolle bei der schnellen Anpassung von sich verändernden Umweltbedingungen spielen.

Auch wurde ein Einfluss von 5'-UTR_D auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} festgestellt. Während in Anwesenheit des *leader*-Bereichs eine bis zu 11-fache Aktivierung von P_{pA} durch GvpE ermittelt wurde, führte dessen Deletion nur noch zu einer bis zu 3,3-fachen Aktivierung von P_{pA} (**Abbildung 27**, **Abbildung 31** sowie **Tabelle 15**, **Tabelle 17**). Zur weiteren Untersuchung der Rolle von 5'-UTR_D während der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} ist die Bestimmung der Sekundärstruktur von 5'-UTR_D *in vivo* sowie die Analyse einer möglichen Interaktion von GvpE und 5'-UTR_D unabdingbar. Eine Wechselwirkung zwischen GvpE und 5'-UTR_D könnte u. a. mittels Immunpräzipitation oder EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) erfolgen.

Insgesamt stellt die Steuerung der Expression der p-vac ein vernetztes System aus einzelnen Regulationsfaktoren und -elementen dar, die auf Transkriptions- wie auch Translationsebene wirken. Die Regulation der mRNA-Synthese erfolgt über den Aktivator GvpE und dessen Gegenspieler GvpD. Die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} wird wiederum von der 5'-UTR_D positiv beeinflusst. Welche Rolle 5'-UTR_D innerhalb der GvpE-vermittelten Aktivierung genau spielt, kann nicht ausgesagt werden.

Zudem steuert 5'-UTR_D die Translation des p-gvpDE-Transkripts. Die Translation des p-gvpFGHIJKLM-Transkripts wird über die 5'-UTR_F reguliert, während 5'-UTR_A die Translation des p-gvpACNO Transkripts kontrolliert. Bei allen 5'-UTRs wurde eine reduzierende Wirkung auf die Translation nachgewiesen. Dies könnte entweder durch die Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen verursacht werden oder auf den verschiedenen Translationsmechanismen der Archaea beruhen, die mit unterschiedlicher Effizienz arbeiten. So konnten in *Sulfolobus* zwei verschiedenen effiziente Translationsmechanismen identifiziert werden, die bei *leader*-losen oder *leader*-haltigen mRNAs beobachtet werden und auf der Rekrutierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren beruhen (Tolstrup et al., 2000).

Im Fall von 5'-UTR_A wurde eine wachstumsabhängige regulatorische Wirkung detektiert. Ebenfalls einen negativen Effekt auf die Translation zeigten die ersten 15 nt der Gasvesikelgene p-gvpD, p-gvpF und p-gvpO. Vermutlich dienen die *leader*-Bereiche sowie die ersten 15 nt der jeweiligen Gene zur Feinregulation der p-vac-Expression und ermöglichen eine definierte Synthese der einzelnen Gasvesikelproteine.

5.2.4. Anwendung des mGFP6-Reportersystems

Voraussetzung für ein zuverlässiges Reportersystem ist (i) eine hohe Genauigkeit bei Veränderungen der Genexpression, (ii) eine hohe Sensitivität, (iii) eine hohe Reproduzierbarkeit der Messdaten und (iv) eine schnelle Bildung sowie wiederum ein schneller Abbau des Reportergens.

Eine hohe Genauigkeit von mGFP6 als Reporter konnte bereits bei der Quantifizierung der sechs, in dieser Arbeit getesteten, Promotoren beobachtet werden. So wiesen alle sechs Promotoren deutliche Unterschiede in ihrer Aktivität und im Aktivitätsmuster auf und können in schwache, mittel-starke und starke Promotoren eingeteilt werden. Mit mGFP6 war es möglich, die breite Spanne an verschiedenen

Promotoraktivitäten zu quantifizieren. So konnten die schwachen Promotoren P_{pD} und P_{pF} , die mittelstarken Promotoren P_{pA} und P_{pO} wie auch die starken Promotoren P_{fdx} und $P2$ anhand der mGFP6-Fluoreszenz charakterisiert werden. Zudem wurden die Auswirkungen verschiedener Regulatoren oder Regulatorelemente auf die *mgfp6*-Expression untersucht. Die Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} führte zu einer deutlichen Erhöhung der mGFP6-Fluoreszenz, dennoch zeigten die ersten 15 nt von verschiedenen haloarchaealen Genen sowie die 5'-UTR von *p-gvpA*, *p-gvpF* und *p-gvpD* einen negativen Einfluss auf die Expressionsrate. Die Ergebnisse demonstrieren die hohe Sensitivität von mGFP6, die nötig war, kleinste Veränderungen der Genexpression zu detektieren. Dies deutet auf eine direkte Proportionalität zwischen der mGFP6-Fluoreszenz und der Stärke der *mgfp6*-Expression hin.

Die mit mGFP6 erhaltenen Daten der Promotoren der p-vac-Region waren, mit Ausnahme von P_{pO} , mit den Ergebnissen aus früheren Studien mit BgaH als Reportergen konsistent (Hofacker et al., 2004). Daher stellen die Unterschiede in der GFP-Fluoreszenzintensität wie auch in der BgaH-Aktivität ein gültiges Maß für Unterschiede in der Reportergenexpression dar. Bei allen sechs Promotoren zeigte sich ein über die einzelnen Wachstumsphasen veränderndes Aktivitätsmuster. So wurde zum Beispiel bei einer *mgfp6*-Expression über P_{pA} oder P_{pO} ein Anstieg wie auch ein Abstieg der Fluoreszenz der Zellen über die Zeit beobachtet. Zudem wurde in allen Fällen eine Reduktion des mGFP6-Signals in der stationären Phase detektiert, was darauf hinweist, dass die Zellen kein mGFP6 akkumulierten. Die relativ langsame Wachstumsrate der Haloarchaea mit einer Generationszeit von ca. 4 h (Robinson et al., 2005) erlaubt die GFP-Faltung sowie dessen Abbau, der für Promotorstudien unabdingbar ist.

Vergleicht man die einzelnen Ergebnisse untereinander, zeigt sich eine hohe Reproduzierbarkeit der Daten. So wiesen die mittels mGFP6 erhobenen Daten der einzelnen Triplikate geringe Abweichungen auf und waren in sich konsistent. Die Wiederholung der einzelnen Messungen an unterschiedlichen Tagen lag zudem innerhalb einer niedrigen Spanne, was die geringen Standardabweichungen verdeutlichen.

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse der Validierung, dass mGFP6 eine einfache, schnelle und sensitive Alternative zu enzymatischen Assays für die Quantifizierung haloarchaealer Genexpressionen darstellt. Die größte Zeitersparnis erfolgt durch die nicht notwendige Zelllyse bei Verwendung von mGFP6 als Reporter. Die Detektion der Fluoreszenz *in vivo* ermöglicht zudem eine mikroskopische Analyse der zu untersuchenden Kulturen. So konnte mittels smRS-GFP die genetische Stabilität verschiedener *Hfx. volcanii* Stämme mikroskopisch bestimmt werden. Im Gegensatz zur Quantifizierung der Expression mit BgaH als Reporter erfolgt die Detektion der mGFP6-Fluoreszenz direkt und nicht über eine enzymatische Reaktion. Daher spielt die Temperatur während der Detektion des GFP-Signals im Gegensatz zu den enzymatischen Assays keine Rolle. Dies verringert auch die Fehleranfälligkeit der Messung im Vergleich zu Assays, die auf der Veränderung eines Substrats basieren. Auch konnten mit mGFP6 die Auswirkungen kleinster Veränderungen innerhalb der p-vac Expression detektiert und eine zusätzliche Feinregulation der p-vac ausgehend einzelner Regulatorelemente festgestellt werden.

Zudem war es mit mGFP6 erstmals möglich, den P_{pO} -Promotor zu charakterisieren. In früheren Untersuchungen mit BgaH wurde keine Promotoraktivität detektiert (Hofacker et al., 2004). Ursache

könnte die N-terminale Fusion der ersten fünf Aminosäuren von pGvpO (MADPA) an den Reporter sein, die zum Funktionsverlust der BgaH führte und mGFP6 nicht negativ beeinflusste.

Trotz der vielen Vorteile von mGFP6 gegenüber der BgaH waren die mit beiden Methoden gewonnenen Daten konsistent. Die beiden unterschiedlichen haloarchaealen Reportersysteme ermöglichen nun die gleichzeitige und quantitative Analyse von zwei Promotoren, wie z. B. im Falle der divergent angeordneten Promotoren P_{pA} und P_{pD} der p-vac. Die bisher angewandte BgaH/mRNA-Analyse (Marschhaus and Pfeifer, 2012) kann durch BgaH/GFP ersetzt werden, um beide Promotoraktivitäten während des gesamten Wachstums in derselben Zellkultur quantitativ zu bestimmen.

Von den mit mGFP6 charakterisierten Promotoren und Regulatorelementen eigneten sich aufgrund ihres konstitutiven Charakters die beiden Promotoren P_{fdx} und P_2 zum Aufbau eines induzierbaren Expressionssystems in Haloarchaea. Da der induzierbare P_{pA} -Promotor ohne 5'-UTRA in der exponentiellen Wachstumsphase eine konstitutive Aktivität aufweist, stellt P_{pA} zusammen mit GvpE eine Alternative zu P_{fdx} und P_2 dar.

Für die Untersuchung der Theophyllin-abhängigen Riboswitche innerhalb eines haloarchaealen, induzierbaren Genexpressionssystems wurde P_{fdx} und P_2 gewählt.

5.3. Transfer der Theophyllin-abhängigen Riboswitche in Haloarchaea

Die Verwendung natürlicher und synthetischer Riboswitche zur konditionalen Genexpression erlangte in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. So konnten Riboswitche bereits in einer Vielzahl eukaryotischer und bakterieller Spezies erfolgreich angewandt werden (Rudolph et al., 2013; Suess et al., 2003; Topp et al., 2011). Die Regulation der bakteriellen Translation mittels Riboswitche basiert auf der Maskierung der SD-Sequenz, wodurch die Interaktion des Ribosoms mit der mRNA verhindert und somit die Translation reprimiert wird. In Archaea kann die Translation mit und ohne SD-Sequenz erfolgen (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004), weswegen die Verwendung von Riboswitchen in Archaea limitiert ist.

Einer der wenigen Riboswitche, bei denen neben der SD-Sequenz auch das AUG-Startcodon sequestriert wird, sind die synthetischen Theophyllin-abhängigen Riboswitche A bis E und E* (Topp et al., 2011). Durch die Bindung von Theophyllin an die Aptamerdomäne erfolgt eine Konformationsänderung der mRNA, wodurch die SD-Sequenz und das AUG-Startcodon für das Ribosom zugänglich werden (Desai and Gallivan, 2004). Der Wirkmechanismus am Beispiel von Riboswitch E* ist in **Abbildung 56** dargestellt.

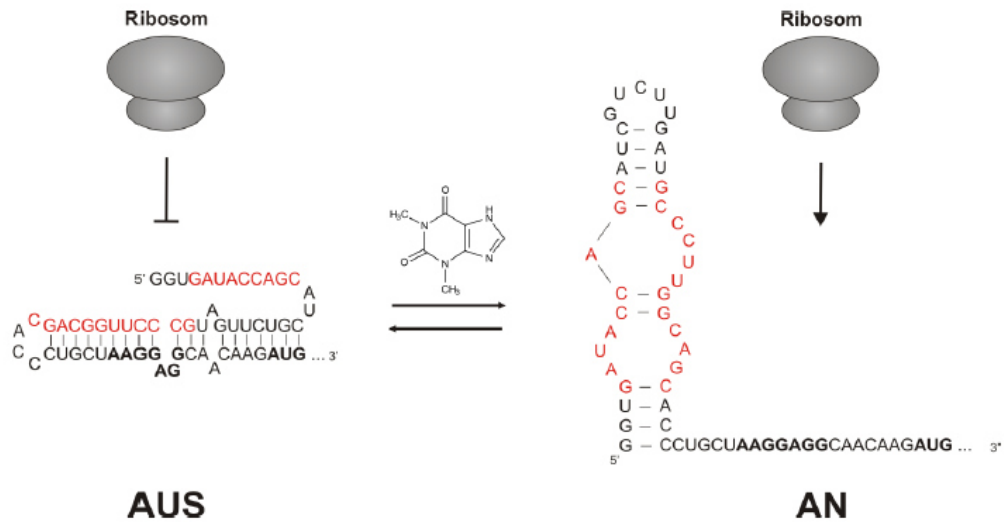


Abbildung 56: Riboswitch E* in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin. In Abwesenheit von Theophyllin wird die SD-Sequenz und das AUG-Startcodon durch die Ausbildung einer Sekundärstruktur maskiert. Durch eine Konformationsänderung ausgehend von Theophyllin wird die SD-Sequenz wie auch das AUG-Startcodon für die Erkennung durch das Ribosom freigegeben. Die Theophyllin-Bindestelle ist in Rot dargestellt. Die SD-Sequenz sowie das AUG-Startcodon sind fett markiert (Rudolph, 2016).

Zur konditionalen Genexpression in verschiedenen Bakterienspezies wurden inzwischen sechs verschiedene Theophyllin-abhängige Riboswitches generiert, die sich in der Nukleotidabfolge ihrer putativen Expressionsplattform unterscheiden. So verfügen die verschiedenen RNA-Schalter über spezifische SD-Sequenzen mit unterschiedlichem Abstand zum AUG-Startcodon (Desai and Gallivan, 2004; Rudolph et al., 2015; Topp et al., 2011).

Mittels der Theophyllin-abhängigen Riboswitches konnte in einer Vielzahl von Bakterienspezies die Genexpression reguliert werden. So wurde neben *E. coli* und *Bacillus subtilis* u. a. auch in *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces coelicolor*, *Mycobacterium smegmatis* oder dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* die Translation über mindestens einen der sechs verschiedenen RNA-Schalter gesteuert. Zudem wurden bis zu 260-fache Aktivierungsfaktoren nach Zugabe des Induktors Theophyllin experimentell bestätigt (Nakahira et al., 2013; Rudolph et al., 2013; Topp et al., 2011).

In *Hfx. volcanii* konnte mittels dem *bgaH*-Reportersystem für Riboswitch E eine 3-fache Aktivierung der Genexpression durch Zugabe von Theophyllin gezeigt werden (Inkubationsbedingungen: 3 M NaCl, 42 °C) (Abbildung 42, Tabelle 22). Die Bildung der mRNA mit dem Riboswitch E stand dabei, wie alle weiteren getesteten Riboswitches, unter der Kontrolle des starken Promotors *P_{fdx}* (Abbildung 41).

Für die Riboswitches A, B, C, D und E* konnte dagegen keine Aktivierung durch Theophyllin in dem getesteten System nachgewiesen werden. Jedoch wurde bei allen sechs eine Repression der basalen Expression in Abwesenheit von Theophyllin beobachtet (Abbildung 42, Tabelle 21), was darauf

hindeutet, dass sich stark gefaltete Sekundärstrukturen ausbilden. Ein Vergleichskonstrukt, das nur CAA-Repeats anstelle der Aptamerdomäne enthält und keine Sekundärstruktur ausbildet, zeigte hingegen keine Repression der Basalexpression (**Abbildung 42, Tabelle 21**).

Die für die Anwendung in Bakterien optimierten Riboswitche A – E und E* unterscheiden sich hauptsächlich in der Nukleotidabfolge der SD-Sequenz und deren Abstand zum AUG-Startcodon (**Abbildung 41**). So konnte beispielsweise bei Experimenten im Gram-positiven Bakterium *S. coelicolor* nachgewiesen werden, dass diejenigen Riboswitche, bei der die Anzahl der zur anti-SD-Sequenz komplementären Nukleotide am höchsten war, auch die stärkste Genexpression bei Zugabe des Induktors besaßen (Rudolph et al., 2015; Rudolph et al., 2013). Es wird vermutet, dass die Nukleotidabfolge und die Lokalisation der SD-Sequenz auch im haloarchaealen Testsystem einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierbarkeit der Riboswitche besitzt.

Bioinformatische Analysen zeigen bei jedem der sechs Theophyllin-abhängigen Riboswitche eine putative haloarchaeale SD-Sequenz (**Tabelle 26**). Diese SD-Sequenzen stimmen für 4 bis 7 nt mit der haloarchaealen Konsensussequenz (5'-GGAGGUGA-3') überein (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Der Abstand der putativen haloarchaealen SD-Sequenz zum AUG-Startcodon in einem Riboswitch beträgt 2 bis 7 nt. Die putativen haloarchaealen SD-Sequenzen sind mit den in den Riboswitchen bereits vorhandenen bakteriellen SD-Sequenzen nicht identisch und sind wenige Nukleotide weiter stromauf- oder stromabwärts lokalisiert (**Tabelle 26**).

Tabelle 26: Putative haloarchaeale SD-Sequenz in den Theophyllin-abhängigen Riboswitchen A – E und E*.

	Riboswitch Sequenz (5'→ 3')*	Übereinstimmung mit Konsensus 5'-GGAGGUGA-3'	Abstand zu AUG
A	CUGAG <u>AAGGGG</u> CAACAAGA <u>AUG</u>	5 (62,5%)	6
B	CGCUGCGCA <u>AGGGGU</u> AUCAACAAGA <u>AUG</u>	5 (62,5%)	7
C	<u>AAGGGACA</u> ACAAGA <u>AUG</u>	4 (50%)	2
D	CUGCU <u>AAGGU</u> AACAACAAGA <u>AUG</u>	5 (62,5%)	7
E	CUGCU <u>AAGGAGGU</u> AACAACAAGA <u>AUG</u>	7 (87,5%)	7
E*	CUGCU <u>AAGGAGGCA</u> ACAAGA <u>AUG</u>	6 (75%)	4

*Putative haloarchaeale SD-Sequenzen in Grau; bakterielle SD-Sequenz ist unterstrichen. Beide sind nicht komplett identisch. AUG-Startcodon ist kursiv und unterstrichen.

In Anwesenheit einer SD-Sequenz wird die Translationseffizienz in Haloarchaea von deren Komplementarität mit der anti-SD-Sequenz der 16S rRNA sowie deren Abstand zum AUG-Startcodon beeinflusst (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Einen großen Einfluss auf die haloarchaeale Expression besitzt das Kernmotiv 5'-GGAGG-3', das sich am 5'-Ende der Konsensussequenz befindet. So führte bspw. die Substitution der SD-Sequenz von p-*gvpH* von „GGAGGUCA“ zu „UUAGGUCA“ zu einer Reduktion der Expression von 90%, obwohl die restlichen 5 Nukleotide nicht verändert wurden (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004).

Während die SD-Sequenzen der Riboswitche A, B, C und D nicht über das Kernmotiv (5'-GGAGG-3') verfügen, wurde das Kernmotiv in Riboswitch E und E* mit 100% Übereinstimmung gefunden.

Mit 87,5% Übereinstimmung der kompletten Konsensus-Sequenz (5'-GGAGGUGA-3') und einem Abstand von 7 nt zum AUG-Startcodon enthält der in *Hfx. volcanii* regulierbare Riboswitch E eine nahezu perfekte haloarchaeale SD-Sequenz ($SD_{RE} = 5'-GGAGGUAA-3'$) und ist zur SD-Sequenz des *p-gvpH*-Gens der *p-vac* ($SD_H = 5'-GGAGGUCA-3'$) fast identisch. Die Entfernung von SD_H zum AUG-Startcodon beträgt ebenfalls 7 nt (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Diese Nukleotidabfolge in Riboswitch E kann der entscheidende Grund für die nachgewiesene 3-fache Aktivierbarkeit der Genexpression bei Zugabe von Theophyllin sein.

Die putative SD-Sequenz in Riboswitch E* (SD_{RE^*}) besitzt eine Übereinstimmung von 6 nt mit der haloarchaealen SD-Konsensussequenz. Im Vergleich zu Riboswitch E zeigte Riboswitch E* keine Theophyllin-induzierte Aktivierbarkeit der Genexpression. Riboswitch E und Riboswitch E* sind für die Anwendung in Gram-positiven Bakterien optimiert (Topp and Gallivan, 2008a; Topp and Gallivan, 2008b; Topp et al., 2011). Sie wurden von Riboswitch D abgeleitet, wobei im Fall von Riboswitch E ein zusätzliches AGG-Triplett inseriert wurde. Bei der Entwicklung von Riboswitch E* wurde das Triplett UAA durch AGG ersetzt (Topp and Gallivan, 2008a; Topp and Gallivan, 2008b; Topp et al., 2011). Dadurch besitzen die SD-Sequenzen von Riboswitch E und E* auch zufälligerweise den zur haloarchaealen Translation wichtigen SD-Kernbereich 5'-GGAGG-3', unterscheiden sich jedoch im Abstand zum AUG-Startcodon. Dass dieser Abstand einen großen Einfluss auf die Translationseffizienz hat, zeigte u.a. die Studie von Sartorius-Neef und Pfeifer, wo ein erforderlicher Mindestabstand von 3 nt zwischen SD-Sequenz und AUG-Startcodon nachgewiesen wurde (Sartorius-Neef and Pfeifer, 2004). Die SD-Sequenzen von Riboswitch E (7 nt Abstand) und Riboswitch E* (4 nt Abstand) erfüllen diesen Mindestabstand zum AUG-Startcodon. Es bleibt zu spekulieren, ob der größere Abstand zwischen der SD_{RE} zum Startcodon in Riboswitch E den entscheidenden Einfluss auf die Aktivierbarkeit dieses Riboswitches durch Theophyllin hat.

Hypersaline Bedingungen, d.h. die Anwesenheit großer Mengen an monovalenten und multivalenten Ionen, können die RNA-Faltung und die RNA-Ligandenbindung beeinflussen (Bizarro et al., 2012; Draper, 2004; Tan and Chen, 2011). Die Abstoßung der negativen Ladungen der RNA wirkt der Faltung einer kompakten Struktur entgegen. Diese Faltung wird durch die Abschirmung der negativen Ladungen aufgrund der Interaktion mit positiven Ionen begünstigt (Draper, 2004). Da die Phosphatladungen bei hohen Salzkonzentrationen stärker durch Gegenionen abgeschirmt werden, ist die potentielle Abstoßungsenergie niedriger, was die Strukturen stabilisiert.

Wie stabil diese Strukturen sein können, wurde bereits 2009 in einer Studie gezeigt, in der die Anwendbarkeit des Tetrazyklin-Aptamers in *Hfx. volcanii* getestet wurde (Hering et al., 2009). Das Tetrazyklin-Aptamer wurde hier 5' an ein *leaderloses* Reportergen fusioniert und sollte bei Anwesenheit von Tetrazyklin die Translationsinitiation durch Ausbildung einer stabilen Struktur unterbinden, so wie es zuvor bei *Saccharomyces cerevisiae* demonstriert wurde (Hanson et al., 2003). Durch das hypersaline

Milieu wurde die Aptamerstruktur vermutlich bereits in Abwesenheit von Tetrazyklin so sehr stabilisiert, dass keine Genexpression nachgewiesen werden konnte (Hering et al., 2009). Ebenso könnten auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Riboswitche bereits in Abwesenheit von Theophyllin durch die hohe intrazelluläre Salzkonzentration im Zytoplasma von *Hfx. volcanii* so stabilisiert worden sein, dass keine Aktivierung mehr möglich war. Inwieweit die intrazellulären Bedingungen die einzelnen Riboswitche beeinflussen und weshalb lediglich bei Riboswitch E eine Aktivierbarkeit nachgewiesen wurde, muss daher in weiteren Studien untersucht werden.

Es ist denkbar, dass bei Riboswitch E die folgenden drei optimalen Bedingungen erfüllt wurden: (i) in Abwesenheit des Liganden Theophyllin wurde eine stabile Sekundärstruktur ausgebildet, (ii) diese Struktur war jedoch nicht so stabil, dass sie nicht durch Theophyllin-Zugabe aufgelöst werden konnte, (iii) nach der Konformationsänderung durch Theophyllin-Zugabe lag die putative SD-Sequenz (mit nahezu optimaler Konsensus-Übereinstimmung) einzelsträngig und für das Ribosom optimal zugänglich vor.

Die Schaltfähigkeit („Aktivierungsfaktor“) wird zum einen von der Basalexpression des Promotor-Riboswitch-Konstruktes in Abwesenheit von Theophyllin (OFF-Zustand) und zum anderen von der Aktivierbarkeit in Anwesenheit von Theophyllin (ON-Zustand) beeinflusst. In weiteren Studien könnten diese beiden Zustände durch Mutationen jeweils stabilisiert und somit die Schaltfähigkeit von Riboswitch E weiter optimiert werden. In dieser Arbeit führten Computer-basierende Analysen zu drei mutierten Versionen von Riboswitch E*, die im Gegensatz zur originalen Version nach vier Wochen eine Schaltfähigkeit aufwiesen. Es ist denkbar, dass durch weitere bioinformatische Strukturvorhersagen Riboswitch-Sequenzen identifiziert werden, welche eine niedrige Basalexpression im OFF-Zustand und eine hohe Expression im ON-Zustand zeigen. Großangelegte *Screenings*, wie sie von der Arbeitsgruppe um Gallivan in genetisch einfach zu manipulierenden Bakterien wie *E. coli* durchgeführt wurden, sind bei Haloarchaeen leider schwer realisierbar. Daher wurde der Einfluss des hypersalinen, intrazellulären Milieus sowie der Anzuchttemperatur von *Hfx. volcanii* auf die Schaltfähigkeit von Riboswitch E untersucht, um durch Veränderungen dieser Parameter die Schaltfähigkeit womöglich zu verbessern.

5.3.1. Einfluss der Salzkonzentration und Temperatur auf Riboswitch E

Haloarchaea besitzen meist eine breite Salz- und Temperaturtoleranz. So ist *Hfx. volcanii* in der Lage, bei 0,7 M bis 5 M NaCl zu wachsen; die optimale Konzentration liegt bei 2,2 M NaCl (Jantzer et al., 2011). Die Temperaturspanne, innerhalb der *Hfx. volcanii* wächst, erstreckt sich von 23 °C bis zu seinem Optimum von 45 °C (Robinson et al., 2005). Um im hypersalinen Habitat existieren zu können, stellt *Hfx. volcanii* ein osmotisches Gleichgewicht zwischen seinem Zellinneren und dem Außenmedium her. Somit herrschen im Zytoplasma ähnliche Salzkonzentrationen wie im Kulturmedium (Christian and Waltho, 1962; Dennis and Shimmin, 1997; Oren, 1999).

Generell zeigte sich eine Zunahme der Schaltfähigkeit von Riboswitch E mit steigender Salzkonzentration. Bei 3 M NaCl wurde eine 3-fach höhere, bei 3,5 M NaCl eine 4-fach und bei 4 M NaCl eine 12-fach höhere *bgaH*-Expression bei Supplementierung von Theophyllin detektiert (**Abbildung 49, Tabelle 24**). Während auf basaler Ebene ohne Theophyllin eine Reduktion der Expression nachgewiesen wurde, konnte in Anwesenheit von Theophyllin eine proportionale Erhöhung mit steigender Salzkonzentration beobachtet werden (**Abbildung 49, Tabelle 24**). Somit scheint bei extrem hohen Salzkonzentrationen die OFF- und ON-Konformation von Riboswitch E stabilisiert zu werden, was in einer ansteigenden Schaltfähigkeit des RNA-Schalters resultiert. Die Theophyllin-Aptamer-Interaktion ist abhängig von der Mg^{2+} Konzentration (Zimmermann et al., 2000). Ob K^+ Ionen, die sich in großer Menge im haloarchaealen Zytoplasma befinden (Christian and Waltho, 1962; Dennis and Shimmin, 1997) auch eine Rolle bei der Liganden-Bindung spielen oder nur eine stabilisierende Wirkung auf die Struktur besitzen, kann nicht ausgesagt werden.

Zudem wird die Schaltfähigkeit von Riboswitch E in *Hfx. volcanii* auch von der Temperatur beeinflusst (**Abbildung 47, Tabelle 23**). So zeigte sich mit steigender Kultivierungstemperatur eine Abnahme seiner Schaltfähigkeit. Durch die Reduktion der Temperatur auf 30 °C wurde dagegen eine 26-fache Aktivierung nach Supplementierung von Theophyllin nachgewiesen. Die Inkubation der Zellen bei 37 °C resultierte in einer 3-fachen Aktivierung von Riboswitch E, während bei einer Kultivierungstemperatur von 42 °C nur noch eine 1,5-fach höhere Expression durch den Induktor detektiert wurde. Bei 45 °C zeigte sich keine Schaltfähigkeit von Riboswitch E mehr. Somit besitzen höhere Kultivierungstemperaturen einen negativen Effekt auf die Aktivierbarkeit von Riboswitch E in *Hfx. volcanii* (**Abbildung 47, Tabelle 23**). Eine mögliche Ursache könnten Fehlfaltungen des Riboswitches bei steigenden Temperaturen sein, die im hypersalinen Milieu deutlich höhere Gewichtung erlangen.

Insgesamt stellten sich eine Kultivierungstemperatur von 30 °C und einen Salzgehalt von 4 M NaCl als die optimalen Parameter zur Anwendung des Theophyllin-abhängigen Riboswitches E in Haloarchaea heraus, die für die Kultivierung von *Hfx. volcanii* im Labor sehr ungeeignete Bedingungen darstellen (d.h. sehr lange Generationszeit) (**Abbildung 46 A und 48 A**). Daher sollte zur Anwendung des Theophyllin-abhängigen Riboswitches E in *Hfx. volcanii* eher eine Kultivierungstemperatur von 37 °C und eine Salzkonzentration von 3 M gewählt werden.

5.4. Anwendung eines Theophyllin-regulierten Expressionssystems in Haloarchaea

Induzierbare Expressionssysteme erlauben die kontrollierte Synthese bestimmter Proteine zu gewünschten Zeitpunkten. Dies hat den Vorteil, die Funktion von Proteinen wie z. B. Transkriptionsfaktoren zu bestimmten Wachstumsphasen der Zelle zu untersuchen. Neben einer temporär abgestimmten Wirkungsweise spielt die Menge eines Regulatorproteins eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung oder Repression der Genexpression. Um den Effekt von unterschiedlichen Mengen eines Regulators auf die Expression gezielt zu untersuchen, ist die Verwendung eines dosisabhängigen Genexpressionssystems hilfreich. Mittels Riboswitch E konnte eine dosisabhängige *bgaH*-Expression beobachtet werden. So wurde in Abwesenheit von Theophyllin eine niedrige Expression detektiert, die mit steigender Induktor-Konzentration bis 2 mM anstieg. Ab 2 mM wurde eine gleichbleibend hohe Expression nachgewiesen (**Abbildung 43, Tabelle 23**). Die Überprüfung, ob Riboswitch E zur dosisabhängigen Translation in einem induzierbaren System eingesetzt werden kann, erfolgte anhand der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} . Um die *c-gvpE*-Expression Theophyllin-abhängig zu regulieren, wurde Riboswitch E im Plasmid pDPAJB18Δ+E zwischen *c-gvpE* und P_{fdx} inseriert. In entgegengesetzter Leserichtung befand sich zur Quantifizierung der Höhe der GvpE-vermittelten Aktivierung das *mgfp6*-Gen unter der Kontrolle von P_{pA} (**Abbildung 53**).

Die Quantifizierung der Induktion von P_{pA} durch cGvpE in Gegenwart von 0, 1, 2 und 3 mM Theophyllin erfolgte über die mGFP6-Fluoreszenz der jeweiligen Transformanten. Bereits bei einer niedrigen *c-gvpE* Expression in Abwesenheit von Theophyllin (0 mM Theophyllin) wurde eine deutliche Induktion von P_{pA} detektiert, die mit Erhöhung der Theophyllin-Konzentration (bis auf 2 mM) anstieg (**Abbildung 55, Tabelle 25**). Die Western Analyse bestätigte einen Anstieg der cGvpE-Menge mit steigender Theophyllin-Konzentration (**Abbildung 54**). Zudem wurde bei einer Theophyllin-Supplementierung von 2 mM und 3 mM keine Unterschiede in der GvpE-Menge mehr detektiert. Generell zeigt dies eine sehr effiziente Aktivierung bereits bei einer niedrigen *c-gvpE*-Expression, wie auch eine Abhängigkeit der P_{pA} -Aktivierung von der Menge an GvpE. Frühere Studien zeigten ein ähnliches Ergebnis für mcGvpE aus *Hfx. mediterranei*. Hier wurde trotz einer drastischen Reduktion der GvpE-Menge durch GvpD eine hohe Induktion von P_{mcA} beobachtet (Zimmermann and Pfeifer, 2003).

5.5. Fazit

Zusammenfassend verdeutlichten die erhaltenen Daten das große Potential von Riboswitchen zur konditionalen Genexpression wie auch von Fluoreszenzproteinen als Reportergene zur Untersuchung der Genexpression in Haloarchaea. Um dieses Potential zu nutzen, sollten neben Mutationsanalysen des Theophyllin-abhängigen Riboswitches E in nachfolgenden Studien weitere Riboswitches, wie z.B. der Neomycin- oder der Ciprofloxacin-abhängige Riboswitch, in Haloarchaea untersucht werden. Auch könnten Ribozyme oder RNA-Thermometer zur konditionalen Genexpression in Haloarchaea getestet werden.

Im Hinblick auf Fluoreszenzproteine steht eine Vielzahl von verschiedenen Varianten zur Verfügung, die es erlauben, die Regulation der Expression auf unterschiedlichen Ebenen zu analysieren. So gibt es neben zahlreichen Farbvarianten u. a. *Fluorescent Timers*, die nach ihrer Aktivierung ihr Farbsignal verändern. Dies ermöglicht die Überwachung von Veränderungen der Genaktivität in lebenden Zellen und somit die Untersuchung zellulärer Prozesse (He et al., 2019; Subach et al., 2009). Die sogenannten *Fluorescent Sensors* können hingegen aufgrund eines Wechsels ihres Anregungs-/Emissionsverhaltens bei sich wandelnden Umgebungsbedingungen zur Detektion von Umweltveränderungen wie pH-Wert oder Ca^{2+} -Konzentrationen verwendet werden (Li and Tsien, 2012; Yang et al., 2018).

Die gewonnenen Daten zeigen, dass in Eukaryoten, wie auch in Bakterien, funktionierende Systeme trotz der hohen intrazellulären Salzkonzentration in Haloarchaea einsetzbar sind. Die Integration des eukaryotischen mGFP6-Reportersystem mit dem synthetischen Theophyllin-abhängigen Expressionssystem ermöglichte die Analyse der Auswirkungen verschieden starker c-gypE-Expressionen auf die Induktion von P_{pA} . Somit stehen künftig zwei verschiedene Systeme zur Untersuchung der haloarchaealen Genregulation zur Verfügung, die bei Bedarf miteinander kombiniert werden können.

6. Referenzen

- Albano, C.R., Randers-Eichhorn, L., Chang, Q., Bentley, W.E., and Rao, G. (1996). Quantitative measurement of green fluorescent protein expression. *Biotechnol Tech* 10, 953-958.
- Albano, C.R., Randers-Eichhorn, L., Bentley, W.E., and Rao, G. (1998). Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production. *Biotechnol Progr* 14, 351-354.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell. *Mol Biol Cell*. New York: Garland Science
- Allers, T., Barak, S., Liddell, S., Wardell, K., and Mevarech, M. (2010). Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*. *Appl Environ Microbiol* 76, 1759-1769.
- Allers, T., and Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nat Rev Genet* 6, 58-73.
- Ao, X., Li, Y., Wang, F., Feng, M., Lin, Y., Zhao, S., Liang, Y., and Peng, N. (2013). The *Sulfolobus* initiator element is an important contributor to promoter strength. *J Bacteriol* 195, 5216-5222.
- Arimbasseri, A.G., Rijal, K., and Maraia, R.J. (2013). Transcription termination by the eukaryotic RNA polymerase III. *Biochim Biophys Acta* 1829, 318-330.
- Arpino, J.A., Rizkallah, P.J., and Jones, D.D. (2012). Crystal structure of enhanced green fluorescent protein to 1.35 Å resolution reveals alternative conformations for Glu222. *PLoS One* 7, e47132.
- Ausubel, F.M.B., R.; Kingston, R. E.; Moore, D.D.S., J. G.; Smith, J. A.; and Struhl, K. (1989). Current protocols in molecular biology. *Mol Reprod Dev* 1, 146-146.
- Baffour-Awuah, N.Y., Fedeles, F., and Zimmer, M. (2005). Structural features responsible for GFPuv and S147P-GFP's improved fluorescence. *Chem Phys* 310, 25-31.
- Baim, S.B., and Sherman, F. (1988). mRNA structures influencing translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8, 1591-1601.
- Baliga, N.S., Goo, Y.A., Ng, W.V., Hood, L., Daniels, C.J., and DasSarma, S. (2000). Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Mol Microbiol* 36, 1184-1185.
- Banerjee, S., Chalissery, J., Bandey, I., and Sen, R. (2006). Rho-dependent transcription termination: more questions than answers. *J Microbiol* 44, 11-22.
- Bauer, M., Marschaus, L., Reuff, M., Besche, V., Sartorius-Neef, S., and Pfeifer, F. (2008). Overlapping activator sequences determined for two oppositely oriented promoters in halophilic Archaea. *Nucleic Acids Res* 36, 598-606.
- Behloul, N., Wei, W., Baha, S., Liu, Z., Wen, J., and Meng, J. (2017). Effects of mRNA secondary structure on the expression of HEV ORF2 proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 16, 200.
- Bell, S.D. (2005). Archaeal transcriptional regulation - variation on a bacterial theme? *Trends Microbiol* 13, 262-265.
- Bell, S.D., Brinkman, A.B., van der Oost, J., and Jackson, S.P. (2001). The archaeal TFIIE α homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO Rep* 2, 133-138.

- Bell, S.D., and Jackson, S.P. (1998). Transcription and translation in archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol* 6, 222-228.
- Benelli, D., La Teana, A., and Londei, P. (2017). Translation Regulation: The Archaea-Eukaryal Connection. In *RNA Metabolism and Gene Expression in Archaea*, B. Clouet-d'Orval, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 71-88.
- Benelli, D., Maone, E., and Londei, P. (2003). Two different mechanisms for ribosome/mRNA interaction in archaeal translation initiation. *Mol Microbiol* 50, 635-643.
- Berquist, B., Müller, J., and Dassarma, S. (2006). Genetic systems for halophilic archaea. *Meth Microbiol* 35, 649-680.
- Bieger, B., Essen, L.-O., and Oesterhelt, D. (2003). Crystal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum*. *Structure* 11, 375-385.
- Bizarro, C.V., Alemany, A., and Ritort, F. (2012). Non-specific binding of Na⁺ and Mg²⁺ to RNA determined by force spectroscopy methods. *Nucleic Acids Res* 40, 6922-6935.
- Bleiholder, A., Frommherz, R., Teufel, K., and Pfeifer, F. (2012). Expression of multiple *tfb* genes in different *Halobacterium salinarum* strains and interaction of TFB with transcriptional activator GvpE. *Arch Microbiol* 194, 269-279.
- Blombach, F., Daviter, T., Fielden, D., Grohmann, D., Smollett, K., and Werner, F. (2013). Archaeology of RNA polymerase: factor swapping during the transcription cycle. *Biochem. Soc. Trans.*, pp. 362–367.
- Blombach, F., Salvadori, E., Fouqueau, T., Yan, J., Reimann, J., Sheppard, C., Smollett, K.L., Albers, S.V., Kay, C.W., and Thalassinou, K. (2015). Archaeal TFE α/β is a hybrid of TFIIE and the RNA polymerase III subcomplex hRPC62/39. *Elife* 4, e08378.
- Braun, F., Thomalla, L., van der Does, C., Quax, T.E.F., Allers, T., Kaever, V., and Albers, S.V. (2019). Cyclic nucleotides in archaea: Cyclic di-AMP in the archaeon *Haloferax volcanii* and its putative role. *Microbiologyopen*, e829, 821-823.
- Breaker, R.R. (2012). Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 4, a003566.
- Brenneis, M., Hering, O., Lange, C., and Soppa, J. (2007). Experimental characterization of Cis-acting elements important for translation and transcription in halophilic archaea. *PLoS genetics* 3, e229.
- Brenneis, M., and Soppa, J. (2009). Regulation of translation in haloarchaea: 5'- and 3'-UTRs are essential and have to functionally interact *in vivo*. *PLoS One* 4, e4484.
- Britton, K.L., Baker, P.J., Fisher, M., Ruzheinikov, S., Gilmour, D.J., Bonete, M.-J., Ferrer, J., Pire, C., Esclapez, J., and Rice, D.W. (2006). Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. *Proc Nat Acad Sci U S A* 103, 4846-4851.
- Chakraborty, A., Wang, D., Ebright, Y.W., Korlann, Y., Kortkhonja, E., Kim, T., Chowdhury, S., Wigneshweraraj, S., Irschik, H., and Jansen, R. (2012). Opening and closing of the bacterial RNA polymerase clamp. *Science* 337, 591-595.
- Chen, W., Yang, G., He, Y., Zhang, S., Chen, H., Shen, P., Chen, X., and Huang, Y.P. (2015). Nucleotides flanking the start codon in hsp70 mRNAs with very short 5'-UTRs greatly affect gene expression in haloarchaea. *PLoS One* 10, e0138473.
- Choi, J.Y., Jang, T.H., and Park, H.H. (2017). The mechanism of folding robustness revealed by the crystal structure of extra-superfolder GFP. *FEBS Lett* 591, 442-447.

- Christian, J.H.B., and Waltho, J.A. (1962). Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochim Biophys Acta* 65, 506-508.
- Condò, I., Ciammaruconi, A., Benelli, D., Ruggero, D., and Londei, P. (1999). Cis-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* 34, 377-384.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20, 448-455.
- Cubitt, A.B., Woollenweber, L.A., and Heim, R. (1999). Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Methods Cell Biol* 58, 19-30.
- Czyz, A., Mooney, R.A., Iaconi, A., and Landick, R. (2014). Mycobacterial RNA polymerase requires a U-tract at intrinsic terminators and is aided by NusG at suboptimal terminators. *mBio* 5, e00931-00914.
- Danner, S., and Soppa, J. (1996). Characterization of the distal promoter element of halobacteria *in vivo* using saturation mutagenesis and selection. *Mol Microbiol* 19, 1265-1276.
- Demolli, S., Geist, M.M., Weigand, J.E., Matschiavelli, N., Suess, B., and Rother, M. (2014). Development of beta-lactamase as a tool for monitoring conditional gene expression by a tetracycline-riboswitch in *Methanosarcina acetivorans*. *Archaea* 2014, 725610.
- Dennis, P.P., and Shimmin, L.C. (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 90-104.
- Desai, S.K., and Gallivan, J.P. (2004). Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *J Am Chem Soc* 126, 13247-13254.
- Deschamps, J.R., Miller, C.E., and Ward, K.B. (1995). Rapid purification of recombinant green fluorescent protein using the hydrophobic properties of an HPLC size-exclusion column. *Protein Expr Purif* 6, 555-558.
- DeVeaux, L.C., Müller, J.A., Smith, J., Petrisko, J., Wells, D.P., and DasSarma, S. (2007). Extremely radiation-resistant mutants of a halophilic archaeon with increased single-stranded DNA-binding protein (RPA) gene expression. *Radiat Res* 168, 507-514.
- Dietrich, C., and Maiss, E. (2002). Red fluorescent protein DsRed from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants. *Biotechniques* 32, 286, 288-290, 292-283.
- Dontsova, O., Kopylov, A., and Brimacombe, R. (1991). The location of mRNA in the ribosomal 30S initiation complex; site-directed cross-linking of mRNA analogues carrying several photo-reactive labels simultaneously on either side of the AUG start codon. *EMBO J* 10, 2613-2620.
- Draper, D.E. (2004). A guide to ions and RNA structure. *RNA* 10, 335-343.
- Dubey, A.K., Baker, C.S., Romeo, T., and Babitzke, P. (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* 11, 1579-1587.
- Dym, O., Mevarech, M., and Sussman, J.L. (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaeobacterium. *Science (New York, NY)* 267, 1344-1346.
- Englert, C., Horne, M., and Pfeifer, F. (1990). Expression of the major gas vesicle protein gene in the halophilic archaeobacterium *Haloferax mediterranei* is modulated by salt. *Mol Gen Genet* 222, 225-232.

- Englert, C., Kruger, K., Offner, S., and Pfeifer, F. (1992a). Three different but related gene clusters encoding gas vesicles in halophilic archaea. *J Mol Biol* 227, 586-592.
- Englert, C., Wanner, G., and Pfeifer, F. (1992b). Functional analysis of the gas vesicle gene cluster of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* defines the vac-region boundary and suggests a regulatory role for the *gvpD* gene or its product. *Mol Microbiol* 6, 3543-3550.
- Enoki, S., Saeki, K., Maki, K., and Kuwajima, K. (2004). Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein. *Biochemistry* 43, 14238-14248.
- Falb, M., Muller, K., Konigsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., von Gronau, S., Gonzalez, O., Pfeiffer, F., Bornberg-Bauer, E., and Oesterhelt, D. (2008). Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles* 12, 177-196.
- French, S.L., Santangelo, T.J., Beyer, A.L., and Reeve, J.N. (2007). Transcription and translation are coupled in archaea. *Mol Biol Evol* 24, 893-895.
- Frolow, F., Harell, M., Sussman, J.L., Mevarech, M., and Shoham, M. (1996). Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat Struct Biol* 3, 452-458.
- Fröls, S., Dyll-Smith, M., and Pfeifer, F. (2012). Biofilm formation by haloarchaea. *Environ Microbiol* 14, 3159-3174.
- Geraskina, N.V., Sycheva, E.V., Samsonov, V.V., Eremina, N.S., Hook, C.D., Serebrianyi, V.A., and Stoyanova, N.V. (2019). Engineering *Escherichia coli* for autoinducible production of L-valine: An example of an artificial positive feedback loop in amino acid biosynthesis. *PLoS One* 14, e0215777.
- Grant, W. D. & Larsen, H. (1989). Extremely halophilic archaeobacteria. Order Halobacteriales ord. nov., p. 2216-2233. in Staley JT, B.M., Pfennig N, Holt JG, Ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Williams and Wilkins*, Baltimore.
- Gregor, D., and Pfeifer, F. (2001). Use of a halobacterial *bgaH* reporter gene to analyse the regulation of gene expression in halophilic archaea. *Microbiology* 147, 1745-1754.
- Gregor, D., and Pfeifer, F. (2005). *In vivo* analyses of constitutive and regulated promoters in halophilic archaea. *Microbiology* 151, 25-33.
- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2001). Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* 276, 29188-29194.
- Groher, F., and Suess, B. (2014). Synthetic riboswitches - A tool comes of age. *Biochim Biophys Acta* 1839, 964-973.
- Grohmann, D., Nagy, J., Chakraborty, A., Klose, D., Fielden, D., Ebright, R.H., Michaelis, J., and Werner, F. (2011). The initiation factor TFE and the elongation factor Spt4/5 compete for the RNAP clamp during transcription initiation and elongation. *Mol Cell* 43, 263-274.
- Guillon, L., Schmitt, E., Blanquet, S., and Mechulam, Y. (2005). Initiator tRNA binding by e/aIF5B, the eukaryotic/archaeal homologue of bacterial initiation factor IF2. *Biochemistry* 44, 15594-15601.
- Gupta, A., and Swati, D. (2019). Riboswitches in archaea. *Comb Chem High Throughput Screen* 22, 135-149.
- Gupta, R., Lanter, J.M., and Woese, C.R. (1983). Sequence of the 16S ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaeobacterium. *Science* 221, 656-659.

- Gusarov, I., and Nudler, E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol Cell* 3, 495-504.
- Hain, J., Reiter, W.D., Hudepohl, U., and Zillig, W. (1992a). Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* 20, 5423-5428.
- Hanson, S., Berthelot, K., Fink, B., McCarthy, J.E., and Suess, B. (2003). Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. *Mol Microbiol* 49, 1627-1637.
- Hanzelka, B.L., Darcy, T.J., and Reeve, J.N. (2001). TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIIEalpha. *J Bacteriol* 183, 1813-1818.
- Hartmann, R., Sickinger, H.D., and Oesterhelt, D. (1980). Anaerobic growth of halobacteria. *PNAS* 77, 3821-3825.
- Hartzog, G.A., and Kaplan, C.D. (2011). Competing for the clamp: promoting RNA polymerase processivity and managing the transition from initiation to elongation. *Mol Cell* 43, 161-163.
- Harvey, I., Garneau, P., and Pelletier, J. (2002). Inhibition of translation by RNA-small molecule interactions. *RNA* 8, 452-463.
- Hausner, W., Lange, U., and Musfeldt, M. (2000). Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* 275, 12393-12399.
- Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C., and Thomm, M. (1996). Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* 271, 30144-30148.
- He, L., Binari, R., Huang, J., Falo-Sanjuan, J., and Perrimon, N. (2019). In vivo study of gene expression with an enhanced dual-color fluorescent transcriptional timer. *Elife* 8, e46181.
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12501-12504.
- Hering, O., Brenneis, M., Beer, J., Suess, B., and Soppa, J. (2009). A novel mechanism for translation initiation operates in haloarchaea. *Mol Microbiol* 71, 1451-1463.
- Heyer, R., Dörr, M., Jellen-Ritter, A., Späth, B., Babski, J., Jaschinski, K., Soppa, J., and Marchfelder, A. (2012). High throughput sequencing reveals a plethora of small RNAs including tRNA derived fragments in *Haloferax volcanii*. *RNA Biol* 9, 1011-1018.
- Hidese, R., Nishikawa, R., Gao, L., Katano, M., Imai, T., Kato, S., Kanai, T., Atomi, H., Imanaka, T., and Fujiwara, S. (2014). Different roles of two transcription factor B proteins in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Extremophiles* 18, 573-588.
- Hirtreiter, A., Damsma, G.E., Cheung, A.C.M., Klose, D., Grohmann, D., Vojnic, E., Martin, A.C.R., Cramer, P., and Werner, F. (2010). Spt4/5 stimulates transcription elongation through the RNA polymerase clamp coiled-coil motif. *Nucleic Acids Res* 38, 4040-4051.
- Hofacker, A., Schmitz, K.M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S., and Pfeifer, F. (2004). GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* 150, 1829-1838.
- Holmes, M., Pfeifer, F., and Dyllal-Smith, M. (1994). Improved shuttle vectors for *Haloferax volcanii* including a dual-resistance plasmid. *Gene* 146, 117-121.

- Honjo, H., Iwasaki, K., Soma, Y., Tsuruno, K., Hamada, H., and Hanai, T. (2019). Synthetic microbial consortium with specific roles designated by genetic circuits for cooperative chemical production. *Metab Eng* 55, 268-275.
- Horne, M., Englert, C., and Pfeifer, F. (1988). Two genes encoding gas vacuole proteins in *Halobacterium halobium*. *Mol Gen Genet* 213, 459-464.
- Horne, M., Englert, C., Wimmer, C., and Pfeifer, F. (1991). A DNA region of 9 kbp contains all genes necessary for gas vesicle synthesis in halophilic archaeobacteria. *Mol Microbiol* 5, 1159-1174.
- Hui, I., and Dennis, P. (1985). Characterization of the ribosomal RNA gene clusters in *Halobacterium cutirubrum*. *J Biol Chem* 260, 899-906.
- Ishii, M., Kunitura, J.S., Jeng, H.T., Penna, T.C., and Cholewa, O. (2007). Evaluation of the pH- and thermal stability of the recombinant green fluorescent protein (GFP) in the presence of sodium chloride. *Appl Biochem Biotechnol* 137-140, 555-571.
- Jackson, S.E., Craggs, T.D., and Huang, J.R. (2006). Understanding the folding of GFP using biophysical techniques. *Expert Rev Proteomics* 3, 545-559.
- Jantzer, K., Zerulla, K., and Soppa, J. (2011). Phenotyping in the archaea: optimization of growth parameters and analysis of mutants of *Haloferax volcanii*. *FEMS Microbiol Lett* 322, 123-130.
- Jones, J.G., Hackett, N.R., Halladay, J.T., Scothorn, D.J., Yang, C.F., Ng, W.L., and DasSarma, S. (1989). Analysis of insertion mutants reveals two new genes in the pNRC100 gas vesicle gene cluster of *Halobacterium halobium*. *Nucleic Acids Res* 17, 7785-7793.
- Jun, S.-H., Hirata, A., Kanai, T., Santangelo, T.J., Imanaka, T., and Murakami, K.S. (2014). The X-ray crystal structure of the euryarchaeal RNA polymerase in an open-clamp configuration. *Nat Commun* 5, 1-11.
- Kaberlin, V.R., and Bläsi, U. (2006). Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol Rev* 30, 967-979.
- Kerscher, L., and Oesterhelt, D. (1977). Ferredoxin is the coenzyme of α -ketoacid oxidoreductases in *Halobacterium halobium*. *FEBS Lett* 83, 197-201.
- Kimata, Y., Iwaki, M., Lim, C.R., and Kohno, K. (1997). A novel mutation which enhances the fluorescence of green fluorescent protein at high temperatures. *Biochem Biophys Res Commun* 232, 69-73.
- Kixmuller, D., and Greie, J.C. (2012). Construction and characterization of a gradually inducible expression vector for *Halobacterium salinarum*, based on the *kdp* promoter. *Appl Environ Microbiol* 78, 2100-2105.
- Kjems, J., Jensen, J., Olesen, T., and Garrett, R.A. (1989). Comparison of transfer RNA and ribosomal RNA intron splicing in the extreme thermophile and archaeobacterium *Desulfurococcus mobilis*. *Can J Microbiol* 35, 210-214.
- Kliemt, J., Jaschinski, K., and Soppa, J. (2019). A haloarchaeal small regulatory RNA (sRNA) is essential for rapid adaptation to phosphate starvation conditions. *Front Microbiol* 10, 1219-1219.
- Kottemann, M., Kish, A., Iloanusi, C., Bjork, S., and DiRuggiero, J. (2005). Physiological responses of the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC1 to desiccation and gamma irradiation. *Extremophiles* 9, 219-227.

- Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* 47, 1-45.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.
- Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position+ 4 but is not generally affected by the nucleotides in positions+ 5 and+ 6. *EMBO J* 16, 2482-2492.
- Kramer, P., Gäbel, K., Pfeiffer, F., and Soppa, J. (2014). *Haloferax volcanii*, a prokaryotic species that does not use the Shine Dalgarno mechanism for translation initiation at 5'-UTRs. *PloS one* 9, e94979-e94979.
- Kremers, G.J., Gilbert, S.G., Cranfill, P.J., Davidson, M.W., and Piston, D.W. (2011). Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci* 124, 157-160.
- Kremers, G.J., Goedhart, J., van Munster, E.B., and Gadella, T.W., Jr. (2006). Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry* 45, 6570-6580.
- Krüger, K., Hermann, T., Armbruster, V., and Pfeifer, F. (1998). The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein. *J Mol Biol* 279, 761-771.
- Krüger, K., and Pfeifer, F. (1996). Transcript analysis of the c-vac region and differential synthesis of the two regulatory gas vesicle proteins GvpD and GvpE in *Halobacterium salinarium* PHH4. *J Bacteriol* 178, 4012-4019.
- Lam, W.L., and Doolittle, W.F. (1989). Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5478-5482.
- Larsen, H., Omang, S., and Steensland, H. (1967). On the gas vacuoles of the halobacteria. *Arch Microbiol* 59, 197-203.
- Laursen, B.S., Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., and Sperling-Petersen, H.U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 101-123.
- Leppek, K., Das, R., and Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 158-174.
- Li, J., Liang, Q., Song, W., and Marchisio, M.A. (2017). Nucleotides upstream of the Kozak sequence strongly influence gene expression in the yeast *S. cerevisiae*. *J Biol Eng* 11, 25.
- Li, Y., and Tsien, R.W. (2012). pHTomato, a red, genetically encoded indicator that enables multiplex interrogation of synaptic activity. *Nat Neurosci* 15, 1047-1053.
- Lisemore, J.L., Jankowski, J.T., Thomas, C.B., Mascotti, D.P., and deHaseth, P.L. (2000). Green fluorescent protein as a quantitative reporter of relative promoter activity in *E. coli*. *Biotechniques* 28, 82-84, 86, 88-89.
- Littlefield, O., Korkhin, Y., and Sigler, P.B. (1999). The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13668-13673.
- Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D.P., and Romeo, T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272, 17502-17510.

- Londei, P. (2005). Evolution of translational initiation: new insights from the archaea. *FEMS Microbiol Rev* 29, 185-200.
- Lunse, C.E., Schuller, A., and Mayer, G. (2014). The promise of riboswitches as potential antibacterial drug targets. *Int J Med Microbiol* 304, 79-92.
- Lynch, S.A., Desai, S.K., Sajja, H.K., and Gallivan, J.P. (2007). A high-throughput screen for synthetic riboswitches reveals mechanistic insights into their function. *Chem Biol* 14, 173-184.
- Ma, J., Campbell, A., and Karlin, S. (2002). Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *J Bacteriol* 184, 5733-5745.
- Mankin, A.S., and Kagramanova, V.K. (1986). Complete nucleotide sequence of the single ribosomal RNA operon of *Halobacterium halobium*: secondary structure of the archaebacterial 23S rRNA. *Mol Gen Genet* 202, 152-161.
- Marschall, L., and Pfeifer, F. (2012). A dual promoter region with overlapping activator sequences drives the expression of gas vesicle protein genes in haloarchaea. *Microbiology* 158, 2815-2825.
- Martin, F.H., and Tinoco Jr, I. (1980). DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo (dA: rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. *Nucleic Acids Res* 8, 2295-2300.
- Martins-Santana, L., Nora, L.C., Sanches-Medeiros, A., Lovate, G.L., Cassiano, M.H.A., and Silva-Rocha, R. (2018). Systems and synthetic biology approaches to engineer fungi for fine chemical production. *Front Bioeng Biotechnol* 6, 117.
- Mellin, J.R., and Cossart, P. (2015). Unexpected versatility in bacterial riboswitches. *Trends genet* 31, 150-156.
- Merkel, P., Perez-Fernandez, J., Pils, M., Reiter, A., Williams, L., Gerber, J., Böhm, M., Deutzmann, R., Griesenbeck, J., Milkereit, P., et al. (2014). Binding of the termination factor Nsi1 to its cognate DNA site is sufficient to terminate RNA Polymerase I transcription *in vitro* and to induce termination *in vivo*. *Mol Cell Biol* 34, 3817-3827.
- Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S., Gadella, T.W., et al. (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4, 555-557.
- Mironov, A.S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L.E., Shatalin, K., Kreneva, R.A., Perumov, D.A., and Nudler, E. (2002). Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* 111, 747-756.
- Miyawaki, A., Shcherbakova, D.M., and Verkhusha, V.V. (2012). Red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications. *Curr Opin Struct Biol* 22, 679-688.
- Müller-McNicoll, M., Rosbach, O., Hui, J., and Medenbach, J. (2019). Auto-regulatory feedback by RNA-binding proteins. *J Mol Cell Biol* 11, 930-939.
- Mwatha, W.E., and Grant, W.D. (1993). *Natronobacterium vacuolata* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon isolated from Lake Magadi, Kenya. *Int J Syst Evol Microbiol* 43, 401-404.
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L., and Breaker, R.R. (2002). Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* 9, 1043-1049.
- Nakahira, Y., Ogawa, A., Asano, H., Oyama, T., and Tozawa, Y. (2013). Theophylline-dependent riboswitch as a novel genetic tool for strict regulation of protein expression in *Cyanobacterium Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol* 54, 1724-1735.

- Ng, W.V., Kennedy, S.P., Mahairas, G.G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H.D., Lasky, S.R., Baliga, N.S., Thorsson, V., Sbrogna, J., *et al.* (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *PNAS* 97, 12176-12181.
- Nomura, S., and Harada, Y. (1998). Functional expression of green fluorescent protein derivatives in *Halobacterium salinarum*. *FEMS Microbiol Lett* 167, 287-293.
- Offner, S., Hofacker, A., Wanner, G., and Pfeifer, F. (2000). Eight of fourteen *gvp* genes are sufficient for formation of gas vesicles in halophilic archaea. *J Bacteriol* 182, 4328-4336.
- Offner, S., and Pfeifer, F. (1995). Complementation studies with the gas vesicle-encoding p-vac region of *Halobacterium salinarum* PHH1 reveal a regulatory role for the *p-gvpDE* genes. *Mol Microbiol* 16, 9-19.
- Offner, S., Wanner, G., and Pfeifer, F. (1996). Functional studies of the *gvpACNO* operon of *Halobacterium salinarum* reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *J Bacteriol* 178, 2071-2078.
- Offner, S., Ziese, U., Wanner, G., Typke, D., and Pfeifer, F. (1998). Structural characteristics of halobacterial gas vesicles. *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 5), 1331-1342.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 334-348.
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biot* 28, 56-63.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4, 2-2.
- Oren, A. (2014). The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *J Biol Res-Thessalon* 21, 23-23.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.
- Parkes, R.J. (2000). A case of bacterial immortality? *Nature* 407, 844-845.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., and Piston, D.W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 73, 2782-2790.
- Pédelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2005). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 24, 79.
- Peng, N., Xia, Q., Chen, Z., Liang, Y.X., and She, Q. (2009). An upstream activation element exerting differential transcriptional activation on an archaeal promoter. *Mol Microbiol* 74, 928-939.
- Pfeifer, F. (2012). Distribution, formation and regulation of gas vesicles. *Nat Rev Microbiol* 10, 705-715.
- Pfeifer, F. (2015). Haloarchaea and the formation of gas vesicles. *Life (Basel)* 5, 385-402.
- Pfeifer, F., Griffig, J., and Oesterhelt, D. (1993a). The *fdx* gene encoding the [2Fe-2S] ferredoxin of *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*). *MGG* 239, 66-71.
- Pfeifer, F., Offner, S., Krüger, K., Ghahraman, P., and Englert, C. (1993b). Transformation of halophilic archaea and investigation of gas vesicle synthesis. *Syst Appl Microbiol* 16, 569-577.
- Pfeiffer, F., Broicher, A., Gillich, T., Klee, K., Mejía, J., Rampp, M., and Oesterhelt, D. (2008). Genome information management and integrated data analysis with HaloLex. *Arch Microbiol* 190, 281-299.

- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M., and Herzberg, O. (1998). Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the dead sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure* 6, 75-88.
- Powers, E.T., Powers, D.L., and Gierasch, L.M. (2012). FoldEco: a model for proteostasis in *E. coli*. *Cell Rep* 1, 265-276.
- Qureshi, S.A., Bell, S.D., and Jackson, S.P. (1997). Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO J* 16, 2927-2936.
- Qureshi, S.A., and Jackson, S.P. (1998). Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol Cell* 1, 389-400.
- Reiter, W.D., Hudepohl, U., and Zillig, W. (1990). Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9509-9513.
- Reiter, W.D., Palm, P., and Zillig, W. (1988). Analysis of transcription in the archaeobacterium *Sulfolobus* indicates that archaeobacterial promoters are homologous to eukaryotic pol II promoters. *Nucleic Acids Res* 16, 1-19.
- Reuter, C.J., and Maupin-Furlow, J.A. (2004). Analysis of proteasome-dependent proteolysis in *Haloferax volcanii* cells, using short-lived green fluorescent proteins. *Appl Environ Microbiol* 70, 7530-7538.
- Reynoso, C.M.K., Miller, M.A., Bina, J.E., Gallivan, J.P., and Weiss, D.S. (2012). Riboswitches for Intracellular Study of Genes Involved in in *Francisella* Pathogenesis. *mBio* 3, e00253-00212.
- Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B., and Piston, D.W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 22, 445-449.
- Roberts, J.W. (1969). Termination factor for RNA synthesis. *Nature* 224, 1168-1174.
- Robinson, J.L., Pyzyrna, B., Atrasz, R.G., Henderson, C.A., Morrill, K.L., Burd, A.M., DeSoucy, E., Fogleman, R.E., Naylor, J.B., Steele, S.M., *et al.* (2005). Growth kinetics of extremely halophilic archaea (Family *Halobacteriaceae*) as revealed by arrhenius plots. *J Bacteriol Res* 187, 923-929.
- Röder, R., and Pfeifer, F. (1996). Influence of salt on the transcription of the gas-vesicle genes of *Haloferax mediterranei* and identification of the endogenous transcriptional activator gene. *Microbiology* 142, 1715-1723.
- Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29, 1321-1330.
- Romeo, T., Vakulskas, C.A., and Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ Microbiol* 15, 313-324.
- Rothschild, L.J., and Mancinelli, R.L. (2001). Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092-1101.
- Rowlands, T., Baumann, P., and Jackson, S.P. (1994). The TATA-binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaeobacteria. *Science* 264, 1326-1329.
- Rudolph, J., and Oesterhelt, D. (1995). Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J* 14, 667-673.
- Rudolph, M.M. (2016). Entwicklung und Anwendung synthetischer RNA-Schalter zur Regulation der Genexpression. Dissertation, TU Darmstadt.

- Rudolph, M.M., Vockenhuber, M.-P., and Suess, B. (2015). Chapter Fourteen - Conditional Control of Gene Expression by Synthetic Riboswitches in *Streptomyces coelicolor*. In *Methods in Enzymology*, D.H. Burke-Aguero, ed. (Academic Press), pp. 283-299.
- Rudolph, M.M., Vockenhuber, M.P., and Suess, B. (2013). Synthetic riboswitches for the conditional control of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* 159, 1416-1422.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (Cold spring harbor laboratory press).
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanders, T.J., Lammers, M., Marshall, C.J., Walker, J.E., Lynch, E.R., and Santangelo, T.J. (2019). TFS and Spt4/5 accelerate transcription through archaeal histone-based chromatin. *Mol Microbiol* 111, 784-797.
- Santangelo, T.J., and Reeve, J.N. (2006). Archaeal RNA polymerase is sensitive to intrinsic termination directed by transcribed and remote sequences. *J Mol Biol* 355, 196-210.
- Santangelo, T.J., Skinner, K.M., and Reeve, J.N. (2009). Archaeal intrinsic transcription termination *in vivo*. *J Bacteriol Res* 191, 7102-7108.
- Sartorius-Neef, S., and Pfeifer, F. (2004). *In vivo* studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* 51, 579-588.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Scheuch, S., Marschaus, L., Sartorius-Neef, S., and Pfeifer, F. (2008). Regulation of *gvp* genes encoding gas vesicle proteins in halophilic archaea. *Arch Microbiol* 190, 333-339.
- Scheuch, S., and Pfeifer, F. (2007). GvpD-induced breakdown of the transcriptional activator GvpE of halophilic archaea requires a functional p-loop and an arginine-rich region of GvpD. *Microbiology* 153, 947-958.
- Schmidt, I., and Pfeifer, F. (2013). Use of GFP-GvpE fusions to quantify the GvpD-mediated reduction of the transcriptional activator GvpE in haloarchaea. *Arch Microbiol* 195, 403-412.
- Schobert, B., and Lanyi, J.K. (1982). Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J Biol Chem* 257, 10306-10313.
- Scholz, O., Thiel, A., Hillen, W., and Niederweis, M. (2000). Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. *Eur J Biochem* 267, 1565-1570.
- Seeliger, J.C., Topp, S., Sogi, K.M., Previti, M.L., Gallivan, J.P., and Bertozzi, C.R. (2012). A riboswitch-based inducible gene expression system for mycobacteria. *PLoS One* 7, e29266.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22, 1567-1572.

- Shine, J., and Dalgarno, L. (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* 254, 34-38.
- Shu, X., Shaner, N.C., Yarbrough, C.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (2006). Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* 45, 9639-9647.
- Simonetti, A., Marzi, S., Jenner, L., Myasnikov, A., Romby, P., Yusupova, G., Klaholz, B.P., and Yusupov, M. (2009). A structural view of translation initiation in bacteria. *Cell Mol Life Sci* 66, 423-436.
- Slupska, M.M., King, A.G., Fitz-Gibbon, S., Besemer, J., Borodovsky, M., and Miller, J.H. (2001). Leaderless transcripts of the crenarchaeal hyperthermophile *Pyrobaculum aerophilum*. *J Mol Biol* 309, 347-360.
- Smollett, K., Blombach, F., Fouqueau, T., and Werner, F. (2017). A global characterisation of the archaeal transcription machinery. In *RNA Metabolism and Gene Expression in Archaea*, B. Clouet-d'Orval, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1-26.
- Soppa, J. (1999). Transcription initiation in archaea: facts, factors and future aspects. *Mol Microbiol* 31, 1295-1305.
- Speed, M.C., Burkhart, B.W., Picking, J.W., and Santangelo, T.J. (2018). An archaeal fluoride-responsive riboswitch provides an inducible expression system for hyperthermophiles. *Appl Environ Microbiol* 84, e02306-02317.
- Stepanenko, O.V., Stepanenko, O.V., Kuznetsova, I.M., Verkhusha, V.V., and Turoverov, K.K. (2014). Sensitivity of superfolder GFP to ionic agents. *PLoS One* 9, e110750.
- Stoeckenius, W., and Kunau, W.H. (1968). Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. *J Cell Biol* 38, 337-357.
- Stoeckenius, W., and Rowen, R. (1967). A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. *J Cell Biol* 34, 365-393.
- Subach, F.V., Subach, O.M., Gundorov, I.S., Morozova, K.S., Piatkevich, K.D., Cuervo, A.M., and Verkhusha, V.V. (2009). Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking. *Nat Chem Biol* 5, 118-126.
- Subach, O.M., Cranfill, P.J., Davidson, M.W., and Verkhusha, V.V. (2011). An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore. *PLoS One* 6, e28674.
- Suess, B., Fink, B., Berens, C., Stentz, R., and Hillen, W. (2004). A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 32, 1610-1614.
- Suess, B., Hanson, S., Berens, C., Fink, B., Schroeder, R., and Hillen, W. (2003). Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res* 31, 1853-1858.
- Tan, Z.-J., and Chen, S.-J. (2011a). Salt contribution to RNA tertiary structure folding stability. *Biophys J* 101, 176-187.
- Tang, T.H., Rozhdestvensky, T.S., d'Orval, B.C., Bortolin, M.-L., Huber, H., Charpentier, B., Branlant, C., Bachellerie, J.-P., Brosius, J., and Hüttenhofer, A. (2002). RNomics in archaea reveals a further link between splicing of archaeal introns and rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 30, 921-930.
- Tavlaridou, S., Faist, K., Weitzel, K., and Pfeifer, F. (2013). Effect of an overproduction of accessory Gvp proteins on gas vesicle formation in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles* 17.

- Tavlaridou, S., Winter, K., and Pfeifer, F. (2014). The accessory gas vesicle protein GvpM of haloarchaea and its interaction partners during gas vesicle formation. *Extremophiles* 18, 693-706.
- Teerawanichpan, P., Hoffman, T., Ashe, P., Datla, R., and Selvaraj, G. (2007). Investigations of combinations of mutations in the jellyfish green fluorescent protein (GFP) that afford brighter fluorescence, and use of a version (VisGreen) in plant, bacterial, and animal cells. *Biochim Biophys Acta* 1770, 1360-1368.
- Teufel, K., Bleiholder, A., Griesbach, T., and Pfeifer, F. (2008). Variations in the multiple *tbp* genes in different *Halobacterium salinarum* strains and their expression during growth. *Arch Microbiol* 190, 309-318.
- Teufel, K., and Pfeifer, F. (2010). Interaction of transcription activator GvpE with TATA-box-binding proteins of *Halobacterium salinarum*. *Arch Microbiol* 192, 143-149.
- Thomas, D.N., and Dieckmann, G.S. (2002). Antarctic sea ice-a habitat for extremophiles. *Science* 295, 641-644.
- Thomm, M., and Wich, G. (1988). An archaeobacterial promoter element for stable RNA genes with homology to the TATA box of higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 16, 151-163.
- Tocchini-Valentini, G.D., Fruscoloni, P., and Tocchini-Valentini, G.P. (2005). Coevolution of tRNA intron motifs and tRNA endonuclease architecture in archaea. *PNAS* 102, 15418-15422.
- Tolstrup, N., Sensen, C.W., Garrett, R.A., and Clausen, I.G. (2000). Two different and highly organized mechanisms of translation initiation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* 4, 175-179.
- Topp, S., and Gallivan, J.P. (2008a). Random walks to synthetic riboswitches—a high-throughput selection based on cell motility. *ChemBioChem* 9, 210-213.
- Topp, S., and Gallivan, J.P. (2008b). Riboswitches in unexpected places—a synthetic riboswitch in a protein coding region. *RNA* 14, 2498-2503.
- Topp, S., Reynoso, C.M.K., Seeliger, J.C., Goldlust, I.S., Desai, S.K., Murat, D., Shen, A., Puri, A.W., Komeili, A., Bertozzi, C.R., *et al.* (2011). Synthetic riboswitches that induce gene expression in diverse bacterial species. *Appl Environ Microb* 77, 2199-2199.
- Torarinsson, E., Klenk, H.-P., and Garrett, R.A. (2005). Divergent transcriptional and translational signals in archaea. *Environ Microbiol* 7, 47-54.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544.
- Wachter, A. (2010). Riboswitch-mediated control of gene expression in eukaryotes. *RNA Biol* 7, 67-76.
- Walker, J.E., Luyties, O., and Santangelo, T.J. (2017). Factor-dependent archaeal transcription termination. *PNAS* 114, E6767-E6773.
- Walsby, A.E. (1994). Gas vesicles. *Microbiol Rev* 58, 94-144.
- Walter, A.E., Turner, D.H., Kim, J., Lyttle, M.H., Muller, P., Mathews, D.H., and Zuker, M. (1994). Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9218-9222.
- Weigand, J.E., and Suess, B. (2007). Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucleic Acids Res* 35, 4179-4185.

- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C.S., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48, 657-670.
- Winkler, W., Nahvi, A., and Breaker, R.R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419, 952-956.
- Winter, K., Born, J., and Pfeifer, F. (2018). Interaction of haloarchaeal gas vesicle proteins determined by split-GFP. *Front Microbiol* 9, 1897.
- Woese, C.R. (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8392-8396.
- Woese, C.R. (2002). On the evolution of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8742-8747.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4576-4579.
- Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N., and Tanaka, N. (2002). The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nat Struct Biol* 9, 691-695.
- Yang, Y., Liu, N., He, Y., Liu, Y., Ge, L., Zou, L., Song, S., Xiong, W., and Liu, X. (2018). Improved calcium sensor GCaMP-X overcomes the calcium channel perturbations induced by the calmodulin in GCaMP. *Nat Commun* 9, 1504, 1501 - 1518.
- Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., and Tsien, R.Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913-916.
- Zimmermann, G.R., Wick, C.L., Shields, T.P., Jenison, R.D., and Pardi, A. (2000). Molecular interactions and metal binding in the theophylline-binding core of an RNA aptamer. *RNA* 6, 659-667.
- Zimmermann, P., and Pfeifer, F. (2003). Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloferax mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE. *Mol Microbiol* 49, 783-794.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	Arbitrary Unit
<i>bgaH</i>	Gen halobakterielle β -Galaktosidase
bp	Basenpaare
BRE	<i>transcription factor B recognition element</i>
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Cytosin
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. "und andere")
EtOH	Ethanol
fwd	vorwärts (<i>forward</i>)
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
<i>gvp</i>	<i>gas vesicle protein-Gen</i>
Gvp	<i>gas vesicle protein</i>
IR	Infrarotstrahlung
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MU	Miller Units
MW	Molekulargewicht
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PNK	Polynukleotidkinase
rev	rückwärts (<i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SD-Sequenz	Shine-Dalgarno-Sequenz
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Abkürzungsverzeichnis

TBP	TATA-Box-Bindeprotein
Tc	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
UAS	<i>upstream activator sequence</i>
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolette Strahlung
Vol.	Volumen

8. Vorträge und Posterpräsentationen

Vorträge:

CompuGene Retreat in Annweiler, 14. bis 16. März 2017

CompuGene Symposium “Computer-aided Engineering of Synthetic Genetic Circuits” in Darmstadt, 19. bis 21. Juni 2017

18th Genome and Function and Gene Regulation in Archaea in Schmitten, 18. bis 19. September 2017

19th Genome and Function and Gene Regulation in Archaea in Schmitten, 16. bis 17. Juli 2018

Posterpräsentationen:

CompuGene Symposium: “Computer-aided Engineering of Synthetic Genetic Circuits” in Darmstadt, 19. bis 21. Juni 2017

69. Mosbacher Kolloquium Synthetic Biology „ Computational Methods for Synthetic Biology” in Mosbach, 22. bis 24. März 2018

Internationale Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Marburg, 01. bis 04. März 2015

Internationale Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Jena, 13. bis 16. März 2016

Internationale Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Würzburg, 5. bis 8. März 2017

Internationale Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Wolfsburg, 15. bis 18. April 2018

Internationale Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Mainz, 17. bis 20. März 2019

9. Curriculum Vitae

Name: Johannes Michael Born
Geburtsort: Würzburg

Akademische Bildung

- 07/2014 – 04/2019** **Promotionsstudium** an der TU Darmstadt, Arbeitsgruppe: Mikrobiologie und Archaea bei Prof. Dr. rer. nat. Felicitas Pfeifer
- Stipendium des evangelischen Studienwerks Schwerte bis einschließlich 06/2016, ab 07/2016 gefördert vom Exzellenzcluster LOEWE
-
- 10/2008 – 08/2013** **Studium der Technischen Biologie** an der Technischen Universität Darmstadt
- Abschluss: Master of Science, Gesamturteil: sehr gut
- Schwerpunkte: Mikrobiologie, Medizinische Entwicklungsbiologie, Neurobiologie, Pflanzenbiotechnologie
- Titel Masterarbeit: Etablierung eines Reportersystems auf der Basis von GFP für Promotorstudien in halophilen Archaea

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Felicitas Pfeifer** für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, bedanken. Ich bedanke mich auch für die vielen Ratschläge, Hilfestellungen und die Unterstützung während dieser Zeit sowie für die mir gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung dieser Arbeit.

Dem Evangelischen Studienwerk Villigst danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums während der ersten 2 Jahre meiner Dissertation.

Mein weiterer Dank gilt **Frau Prof. Dr. Beatrix Süß** für die hilfreichen Tipps sowie die wertvolle Unterstützung zur Etablierung der Riboswitche in Haloarchaea. Auch möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates und die Möglichkeit, die Fluoreszenzmessungen innerhalb ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen zu dürfen, bedanken.

Ich bedanke mich bei **PD Dr. Arnulf Kletzin** für seine große Hilfsbereitschaft bei allerlei Problemen und für seine vielen Ratschläge.

Ich möchte mich bei **Dr. Sabrina Sommerlad** für die sehr gute Betreuung zu Beginn meiner Promotion, für die fortwährende Motivation sowie die Unterstützung beim Lösen von Problemen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen wie auch Freunden **Gerald Losensky, Sabrina Völkel, Kerstin Völkner, Patrick Rühl, Alisa Jost, Patrick Haas, Gisela Schaffert, Sabrina Sommerlad, Britta Schreiber, Kerstin Weitzel** und **Uwe Pöll** für die sehr schöne Zeit „im“ wie auch „außerhalb“ des Labors. Zudem möchte ich mich für die Hilfe bei Problemen wie auch für die zahlreichen Diskussionen bedanken, was zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein Dankeschön auch an alle weiteren Mitglieder der **AG Pfeifer** und **AG Kletzin** sowie den Mitgliedern der **AG Simon** für die schöne Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank geht an **Martin Rudolph** für die große Unterstützung während dieser Zeit und für das Korrekturlesen der Dissertation.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner **Familie** bedanken, ohne die mein Biologiestudium wie auch diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den